

皮膚感作性試験の適用性拡大に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

前 田 洋 祐

2020 年 9 月

## 目次

### 序章 緒言

P-1 皮膚感作性とは

P-2 皮膚感作性試験の意義

P-3 皮膚感作性試験とリスクコミュニケーション

P-4 本研究の目的

### 第1章 LLNA:BrdU-ELISA を用いた GHS 細区分の提案

1-1 小序

1-2 GHS 細区分基準の設定

1-3 CBA/J マウスを用いた GHS 細区分基準の検証

1-4 LLNA における感作性判定及び感作性強度のマウスの系統間比較

1-5 小括

### 第2章 新規光アレルギー性評価法の開発

2-1 小序

2-2 LLNA を応用した新規光アレルギー性試験法の開発と予測精度の検証

2-3 小括

## 第3章 ケラチノサイト活性化を指標とした新規 *in vitro* 皮膚感作性試験法の

開発

### 3-1 小序

### 3-2 ケラチノサイト活性化検出のためのレポーター遺伝子構造及び宿主細胞

の検討

### 3-3 安定発現株の構築及び安定発現株を用いた試験法の開発

### 3-4 小括

## 終章 総括と結論

研究発表実績

要約

謝辞

参考文献

## 序章 緒言

### P-1 皮膚感作性とは

化学物質は我々の生活の中で広く普及している製品の原料として使用され、製造過程の反応中間体などを含むと日常生活のみならず労働環境においても意図しない接触性皮膚炎を引き起こすことがある (Fig. 1)。化学物質によるアレルギー性接触皮膚炎は刺激性を示さない微量な濃度においても皮膚のかぶれ及び炎症を引き起こし、化学物質を扱う労働環境によっては就労困難になる場合もあるため、労働衛生上においても非常に重要な問題となる (武吉、2005)。

化学物質のアレルギー性接触皮膚炎を起こす性質を皮膚感作性といい、皮膚感作により生じるアレルギー性接触皮膚炎は遅延型アレルギーもしくはIV型アレルギーと呼ばれ、活性化された T リンパ球が主体となる細胞性免疫である。

アレルギー性接触皮膚炎に至るまでの過程は、以下の 4 段階に分けられる。

①化学物質との接触、②アレルギー性物質の認識、③アレルギー性物質の再認識、④アレルギー性物質を認識する細胞によるばく露局所組織の破壊

これらの 4 段階の過程のうち、①及び②を感作相といい、感作のメカニズムを Fig. 2 に示した。接触により化学物質が皮膚中に透過すると、化学物質は表



皮タンパク質と結合することで、ケラチノサイトによって産生された炎症性のサイトカインやケモカインによって活性化した抗原提示細胞に捕捉・処理される。その後、抗原提示細胞が近傍のリンパ節へ遊走し、リンパ節内でリンパ球に化学物質の情報を伝達する抗原提示が行われ、化学物質を認識したリンパ球（感作リンパ球）が分化・増殖して全身へ分布することで感作が成立し、アレルギー状態となる。その化学物質に再度曝露され、曝露局所の皮膚組織がその化学物質を認識する感作リンパ球によって攻撃・破壊され、その結果炎症（皮膚炎）が引き起こされる。ここで③及び④の過程は惹起相と呼ばれる（武吉、2005）。

化学物質の皮膚感作性は、一度罹患してしまうと完治することは困難で生活の品質を著しく低下させてしまうため、化粧品、医薬品原料及び農薬など、さまざまな化学物質の承認申請において評価が必要な健康有害性であり、化学物質の皮膚感作性の評価は公衆衛生及び労働衛生上非常に重要である。

## P-2 皮膚感作性試験の意義

皮膚感作に関連する生体反応の経路は Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) によって有害性転帰経路 (Adverse Outcome Pathway: AOP) としてまとめられている (OECD, 2012)。皮膚感作性 AOP は応答レベルごとに次の4つのキーイベント (KE) があり、これらを経て Adverse Outcome (AO) である炎症に至る (Fig. 3)。

KE-1:表皮タンパク質との共有結合

KE-2:ケラチノサイトの活性化

KE-3:樹状細胞の活性化

KE-4:リンパ球の分布

AO:炎症

動物を用いた皮膚感作性試験法として、AO まで評価するモルモットを用いた Guinea pig maximization test (GPMT: Magnusson and Kligman, 1969) 及び Buehler test (BT: Buehler, 1965) (Fig. 4) があり、OECD Test Guideline (TG) 406 として収載され (OECD, 1992)、これまでに多くのデータ取得に用いられてきた。これらの手法は AO である炎症の発症の有無を目視観察して皮膚感作性を評価するため、定性的な結果しか得られず、試験期間が長期間、動物に苦

痛を与えるという問題もあった。これらの問題に対し、Kimber *et al.* (Kimber *et al.*, 1989; Basketter *et al.*, 1996) によって開発されたマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) は、KE-4 までを評価することで試験期間を短くかつ動物への苦痛を軽減し、リンパ球の増殖反応を放射性標識された Thymidine (3H-TdR) の取り込みを測定することで定量評価を可能にした (Fig. 5)。さらに本法は陽性となる最少濃度である EC3 値を算出することで、皮膚感作性強度を定量的に評価することが可能である (Kimber *et al.*, 2003)。LLNA は OECD TG429 (OECD, 2010) として収載され、前述の利点などから動物を用いる試験法として第一選択とされており、世界的に広く利用されている試験法である。

一方で、動物愛護の観点から 2013 年に EU 化粧品規制が発効され (EU, 2013)、動物実験を実施した物質を含む化粧品の EU 圏内での流通が禁止された。このため、動物を用いない皮膚感作性試験代替法 (以下代替法) の開発及び TG 化が活発化している。日本国内においても、2018 年には厚生労働省から 3 つの異なる KE をカバーする代替法全てで陰性結果が得られた場合陰性結果を採用できるガイダンスが発効された (厚生労働省, 2018)。このように近年では世界中において動物愛護が重視されてきており、現段階では完全移行は不可能なもの、皮膚感作性試験を取り巻く環境では動物を用いない試験法の利用への移行していく流れとなっている。

### P-3 皮膚感作性試験とリスクコミュニケーション

これまでに、化学物質の皮膚感作性を予測する試験法について述べてきたが、ヒトへの有害性影響を軽減させるためには試験法の整備と並行して、健康リスクの低減のための有害性情報の共有化、すなわちリスクコミュニケーションが必要である。Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) は、化学品の危険有害性ごとに分類基準及びラベル (Fig. 6) や安全データシートの内容の調和を目的とした国際連合によって定められた世界的に統一されたルールであり、リスクコミュニケーションツールとして世界中で広く利用されている (UN、2019)。GHS では化学物質の有害性影響の度合いによって分類される。皮膚感作性については、皮膚感作性を有する物質に関しては区分 1 と分類され、なかでも感作性強度の強さによって細区分することができ、強度の感作性物質は区分 1A、その他の感作性物質は区分 1B と分類される。この細区分に関しては動物試験のデータを用いて分類する場合は OECD TG406 及び OECD TG429 の試験結果を用いて分類可能で、現在 *in vitro* 試験法を含むその他の試験法に関しては区分 1 まで分類が可能である。

細区分は消費者や労働者に強い感作性物質を警告できるため、より正確なリスクアセスメントを可能にし、ヒトの健康を守るためにも非常に有益な情報と

なる。

#### P-4 本研究の目的

動物を用いた試験法では LLNA が主流となっているが、LLNA は放射性同位体 (RI) を用いるため、日本国内においては法令に従い専用の放射線施設ならびに国家資格である放射線取扱主任者の選任が必要となり、実施が困難であった。これを克服するため、我々は RI を用いない LLNA:BrdU-ELISA を開発し (Fig. 7: Takeyoshi *et al.*, 2001)、公的なバリデーション研究を経た後 OECD TG442B として収載され (OECD, 2018)、既に実用化されている。しかしながら、LLNA:BrdU-ELISA は GHS 細区分の基準が存在しないため、リスクコミュニケーションとして強い感作性物質を警告するためには、本法を用いた新たな GHS 細区分の基準を設定する必要がある (課題①)。

また、皮膚感作性の 1 つの表現系として光アレルギー性があり、化粧品や医薬品の有害性作用として重要である。評価方法としては Adjuvant and Strip 法 (Sato *et al.* 1980) 及びハーバー法 (Herber 1969) のようなモルモットを用いた試験法が一般的に用いられているが、これらの既存の光アレルギー性試験法は、惹起相の皮膚反応を評価するため、比較的多くの動物と長い実験期間が必要であった。さらに、ICH ガイドライン S10 (2013) では、これらの既存の光アレルギー性試験法は、ヒトに対して予測可能性が未知であり、公式なバリデーションも実施

されていないため、経皮暴露される光アレルギー性物質を予測に用いることは推奨されないとされている。そのため、LLNA のような動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法の開発が必要である（課題②）。

ここまで、動物を用いる皮膚感作性試験の課題を挙げてきたが、動物を用いない皮膚感作性試験にも課題があった。これまでに開発され OECD TG 化されてきた代替法は OECD の皮膚感作性 AOP 中の KE-1、KE-2 及び KE-3 のいずれか 1 種をカバーした試験となっている。いずれの試験法も単独での試験法では測定精度上に問題があるため、異なる原理の代替法を組み合わせる Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) が OECD でガイダンス化されつつある (OECD, 2019)。このうち、KE-2 を評価する試験法としては KeratinoSens<sup>TM</sup> 及び LuSens と呼ばれる手法が OECD TG442D (OECD, 2018) となっており、広く利用されている。しかしながら、これらの試験法は偽陰性及び偽陽性と判定される物質があり、測定精度上の問題を有する。さらに本試験で用いる用量を決定するために細胞毒性を評価するため別に予備試験を必要とし、本試験においてもケラチノサイトの活性化とは別に細胞毒性試験をする必要があり煩雑である。そこで、ヒトへの感作性リスク低減のためにより高精度かつ簡便な試験法の開発が必要となっている（課題③）。

以上のことから、本研究では、課題①に対しては我々が開発した LLNA :

BrdU-ELISA を用いた GHS 細区分の基準の設定及び実用性の検証を行い、課題②に対しては皮膚感作性試験法として信頼性の高い LLNA を応用した高精度かつ簡便な新規光アレルギー性試験法の開発を行い、課題③に対してはケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時評価可能な高精度かつ簡便な新規 *in vitro* 皮膚感作性試験法の開発を行い、皮膚感作性試験法の適用性を拡大することでこれらの課題の解決を試み、化学物質のヒトに対する有害性評価及びリスクコミュニケーションの発展と、化学物質によるヒトへの有害影響の低減に貢献することを目的とした。



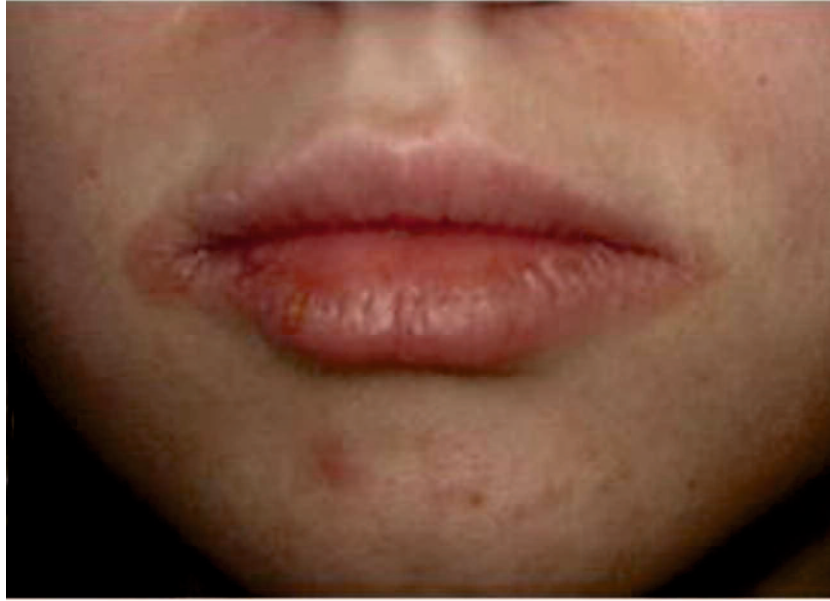


Fig. 1 Allergic contact dermatitis caused by fragrances manifesting as cheilitis after application of lipstick (Salvador *et al.*, 2017)

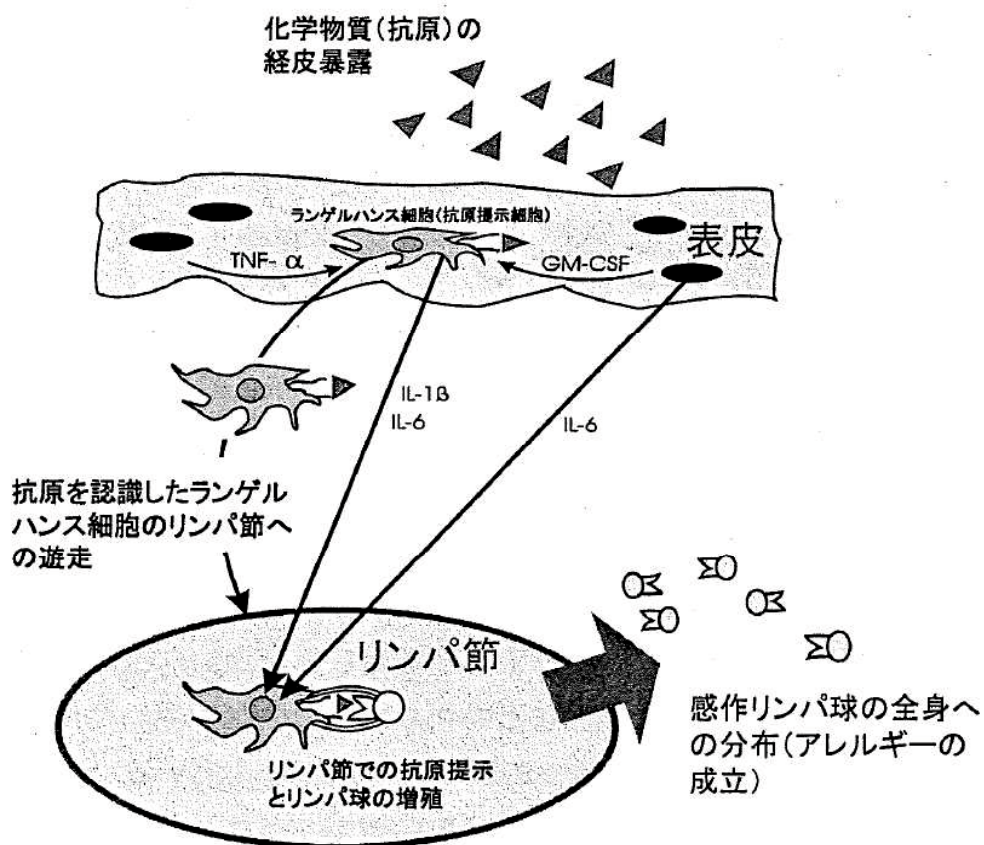


Fig. 2 Mechanism of skin sensitization (武吉, 2005)

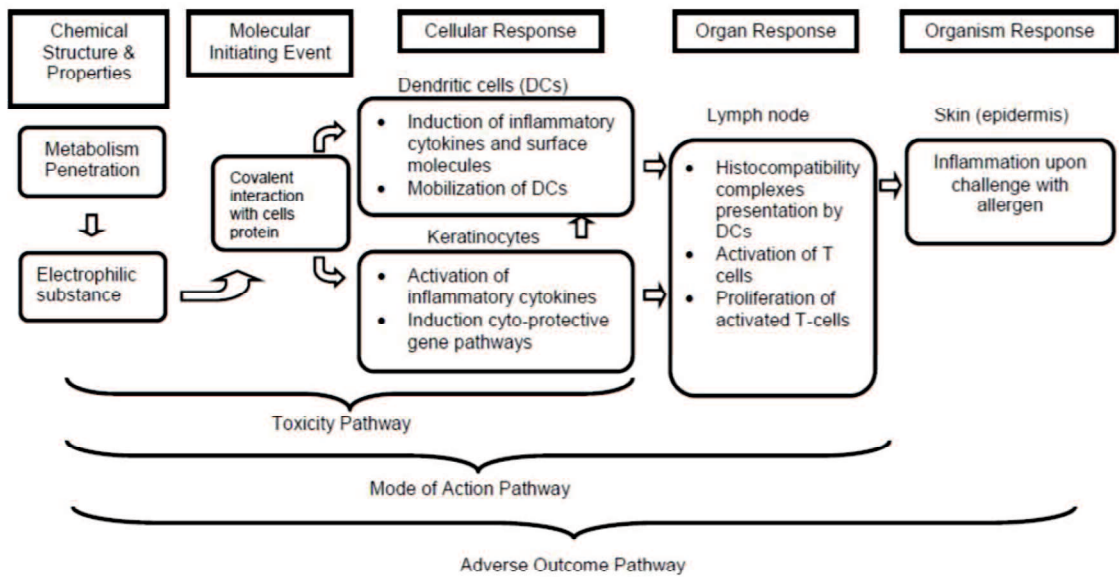


Fig. 3 Skin sensitization Adverse Outcome Pathway (OECD, 2012)

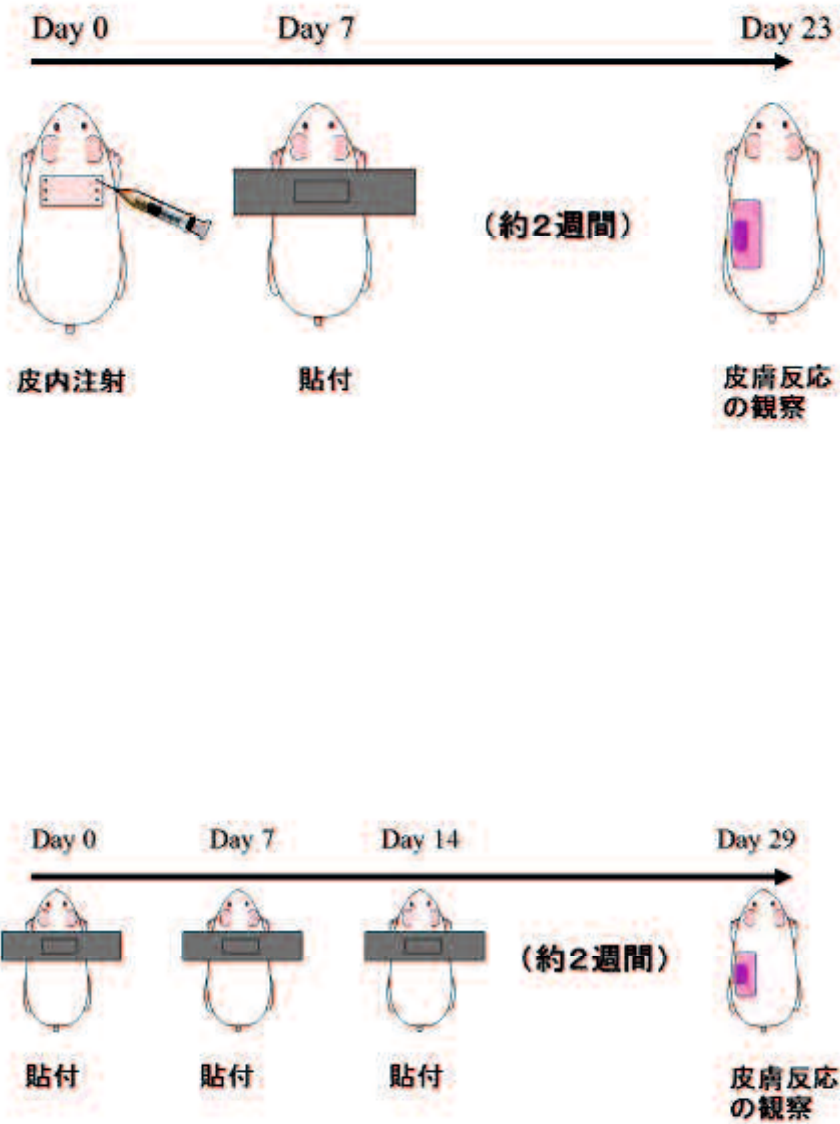


Fig. 4 Outline of Guinea pig maximization test (above, Magnusson and Kligman, 1969) and Buehler test (below, Buehler, 1965)

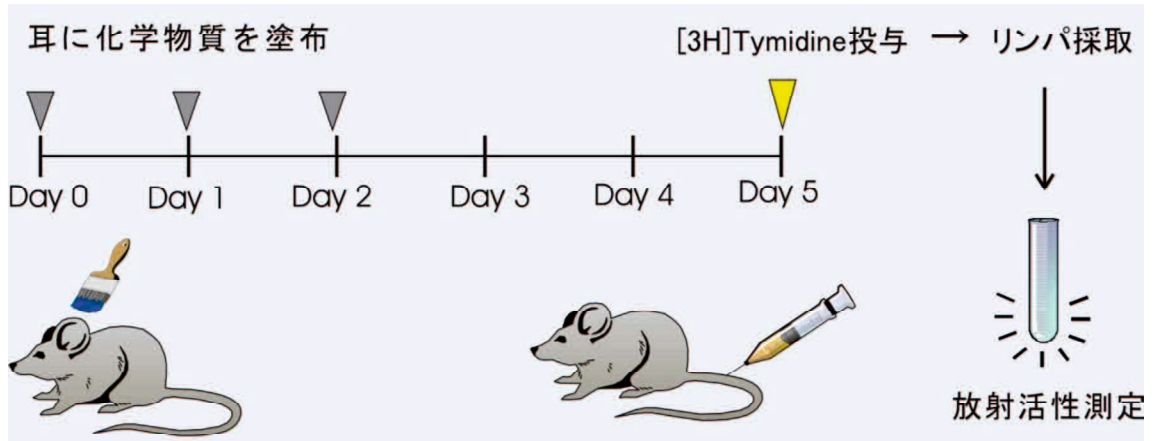


Fig. 5 Outline of local lymph node assay (LLNA: Kimber *et al.*, 1989; Basketter *et al.*, 1996)

			
<p>急性毒性（区分4）、 皮膚腐食性・刺激性（区分2）、 眼に対する重篤な損傷・眼刺激性（区分2A）、 皮膚感作性、 特定標的臓器・全身毒性（単回ばく露）（区分3）</p>	<p>急性毒性（区分1-3）</p>	<p>皮膚腐食性・刺激性（区分1A-C）、 眼に対する重篤な損傷・眼刺激性（区分1）</p>	<p>呼吸器感作性、 生殖細胞変異原性、 発がん性、 生殖毒性、 特定標的臓器・全身毒性（単回ばく露）（区分1-2）、 特定標的臓器・全身毒性（反復ばく露）、 吸引性呼吸器有害性</p>

Fig. 6 GHS label for human health hazard (UN, 2019)

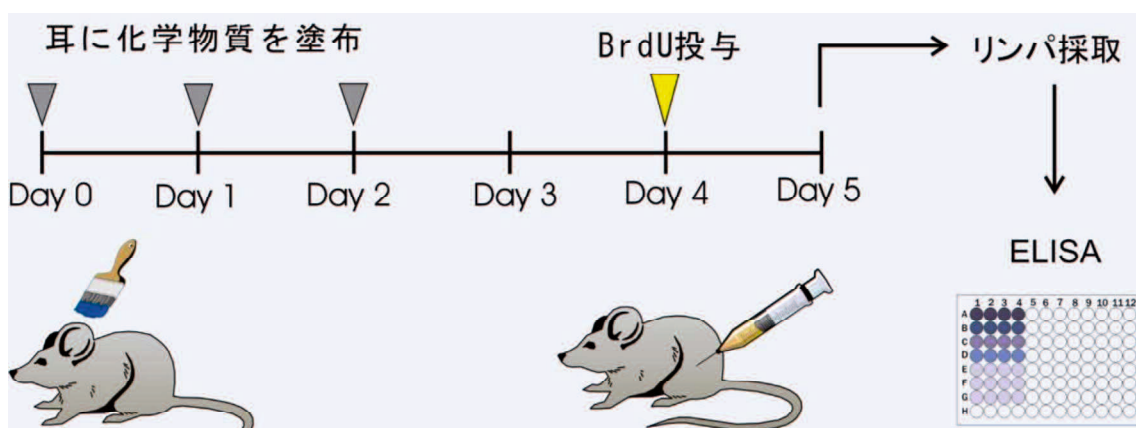


Fig. 7 Outline of LLNA:BrdU-ELISA (Takeyoshi *et al.*, 2001)

## 第1章 LLNA:BrdU-ELISA を用いた GHS 細区分の提案

### 1-1 小序

皮膚感作性によって引き起こされるアレルギー性接触皮膚炎は広く認知された労働衛生及び公衆衛生問題であり (Kimber *et al.* 2002, 2011)、一生を通じて我々の生活や労働環境に有害をもたらす。従って、化学物質の皮膚感作性ポテンシャルの評価及びリスクコミュニケーションすることは、ヒトにおける皮膚感作性リスクを最小限にとどめるために非常に有用である。

Globally Harmonized System (GHS) による化学物質の分類とラベリングは、化学物質からヒトの健康や環境を保護することを目的とした化学物質の物理化学的有害性や毒性情報を供給し、安全な化学物質の利用のために必要な情報を供給する全世界で利用されている有害性情報の伝達システムである (United Nations, 2019)。

近年、Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) の国際標準化されたテストガイドライン (TG) となっている Guinea pig maximization test 及び Buehler test などのモルモットを用いた皮膚感作性試験法 (OECD TG406) や、マウスを用いた Local Lymph Node Assay (LLNA, OECD TG429:本章では区別の



ため LLNA-RI と表記する) が GHS 区分 1 化学物質を分類する方法として広く知られている。これらの 3 つの試験法は化学物質の感作性ポテンシャルに基づき、GHS 細区分 1A/1B を分類することが可能である。

LLNA: BrdU-ELISA は RI を用いないように改変された LLNA であり、2010 年に OECD TG442B となった手法である (Takeyoshi *et al.* 2001, 2003, 2005)。LLNA: BrdU-ELISA は Japanese Center for Validation of Alternative Methods (JaCVAM) による公式なバリデーション試験によって科学的に最適化された手法であり (Kojima *et al.* 2011)、Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) によってピアレビューがなされているため、GHS 区分 1 の分類が可能である。しかしながら GHS 細区分に関しては適用性と分類のための基準は未だに評価されていない。

また、LLNA : BrdU-ELISA は、当時日本国内で入手できる CBA/J 系統のマウスが CBA/JN のみであったため、CBA/JN マウスが用いられており、施設間バリデーションも CBA/JN マウスを用いて実施された。そのため、OECD TG442B においても使用マウスとして CBA/JN マウスが記載されているが、現在 CBA/JN マウスの商業的な流通がなくなり入手不可能な状態となっている。一方、現在 LLNA における推奨系統として CBA/J マウスおよび CBA/Ca マウスが挙げられており、世界中において LLNA に一般的に使用されている。

そこで本章では、LLNA:BrdU-ELISAにおける最適なGHS細区分基準を見出すことを目的とし、LLNA: BrdU-ELISAのピアレビューの際に用いられたデータの再解析を行い、GHS細区分基準を決定し、決定した基準に関して現在使用可能なCBA/Jマウスを用いたLLNA:BrdU-ELISAにおける適用可能性を評価した。

## 1-2 GHS細区分基準の設定

### はじめに

1-2ではICCVAM Test Method Evaluation Report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (ICCVAM, 2010a) を再解析し、GHS細区分基準の設定を行った。

### 材料と方法

#### Data source

本研究で用いられたデータはICCVAM Test Method Evaluation Report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (ICCVAM, 2010a) に記載のあるものを用いた。

LLNA : BrdU-ELISAは我々が開発したのち、国内におけるバリデーション研究が行われ、米国の代替法評価機関であるICCVAM主導のピアレビューの後、ICCVAM Test Method Evaluation Report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISAとしてまとめられた。ピアレビューのデータセット中、ICCVAM report (Table 1) リストの陽性物質全32物質を再解析した。これらの物質はLLNA-RIにおいて $SI \geq 3$ 、LLNA: BrdU-ELISAにおいて $SI \geq 1.6$ の基準で陽性と判定

された物質である。

EC3及びEC1.6は各LLNAで陽性反応を示す推定濃度のことであり、下記の計算式から算出した (Basketter *et al.* 1999)。

$$EC_x = c + \{(X-d)/(b-d)\} \times (a-c) \quad X=3 \text{ or } 1.6$$

計算式は用量反応曲線中、陽性基準であるSI値3もしくは1.6を上回る (用量, SI) である (a, b)、下回る (用量, SI) である (c, d) をそれぞれ用いた。

EC値はヒトの皮膚感作性強度と相関性が良く、化学物質の皮膚感作性強度の判定に有用な値である (Kimber *et al.* 2003)。

32の感作性物質は、ICCVAM report (ICCVAM, 2010a) のLLNA-RIのEC3値を使用してGHS区分1AまたはGHS区分1Bに分類した。

全感作性物質のGHS細区分は次のように細区分した (United Nations, 2019)。

EC3≤2% : GHS区分1A、EC3> 2% : GHS区分1B

Table 1-3に示す通り、13の化学物質がGHS区分1Aに分類され、19の化学物質がGHS区分1Bに分類された。

## LLNA: BrdU-ELISAによる最適なGHS細区分カットオフ値 (%) の決定

GHS細区分の最適なカットオフ値 (%) を決定するために、暫定カットオフ値を1%から10%の1%間隔で設定し、その後各暫定カットオフ値に関して次の式で得られたLLNA-RIとの一致率 (%) 及び非一致率 (%) を算出した。

一致率 (%) = (LLNA: BrdU-ELISAによる各細区分の一致数/LLNA-RIによる細区分数) x 100

非一致率 (%) = (LLNA: BrdU-ELISAによる各細区分の非一致数/ LLNA-RIによる細区分数) x 100

## 結果

### EC1.6値

LLNA: BrdU-ELISAによるEC1.6値をTable 1にまとめた。

GHS区分1Aの化学物質のEC1.6値は0.065%-12.907%の範囲であり、GHS区分1BのEC1.6値は0.862%-73.596%の範囲となった。

### LLNA: BrdU-ELISAによる最適なGHS細区分カットオフ値 (%) の決定

細区分の各カットオフ値 (%) に対する一致数/非一致数の割合をTable 2aに示した。細区分の最適なカットオフ値は6%または7%であると決定され、GHS区分1A及びGHS区分1Bの化学物質の最大一致率はそれぞれ92.3%及び84.2%と算出された。マウスの系統によって結果が異なることが知られている2-Mercaptobenzothiazoleを除くと、GHS区分1Aの一致率は100%となった (Table 2b)。

## まとめ

LLNA : BrdU-ELISAのGHS細区分基準の設定のため、ICCVAM Test Method Evaluation Report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (ICCVAM, 2010a) を再解析したところ、最適なカットオフ値はEC1.6値 6%と決定でき、GHS区分1A及びGHS区分1Bの化学物質の最大一致率はそれぞれ92.3%及び84.2%と算出され、2-Mercaptobenzothiazoleを除くと、GHS区分1Aの一致率は100%となった。

Table 1. Data set of chemicals used in this study

Chemical name	GHS classification	RI-LLNA EC3 (%)	LLNA : BrdU-ELISA EC1.6 (%)
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one solution	1A	0.009	0.065
p-Benzoquinone	1A	0.01	0.15
2,4-Dinitrochlorobenzene	1A	0.049	0.032
Diphenylcyclopropanone	1A	0.05	0.45
Glutaraldehyde	1A	0.083	0.115
4-phenylenediamine	1A	0.11	0.285
Formaldehyde	1A	0.5	0.163
Cobalt chloride	1A	0.66	0.316
4-Methylaminophenol sulfate	1A	0.8	1.081
trans-Cinnamaldehyde	1A	1.4	1.53
Isoeugenol	1A	1.5	5.156
2-Mercaptobenzothiazole	1A	1.7	12.907
Cinnamic aldehyde	1A	1.9	4.808
3-aminophenol	1B	3.2	2.99
Diethyl malate	1B	3.6	8.049
Trimellitic anhydride	1B	4.7	0.862
Nickel sulfate	1B	4.8	1.027
4-Chloroaniline	1B	9	11.029
Sodium lauryl sulfate	1B	8.1	13.334
Citral	1B	9.2	7.143
Hexyl cinnamic aldehyde	1B	9.7	12.92
Eugenol	1B	10.1	8.851
Phenyl benzoate	1B	13.6	16.954
Cinnamic alcohol	1B	21	24.091
Cyclamen aldehyde	1B	22.3	41.496
Hydroxycitronellal	1B	24	13.636
Imidazolidinyl urea	1B	24	49.545
Ethylene glycol dimethacrylate	1B	28	31.751
Linalool	1B	30	27.596
Ethyl acrylate	1B	32.8	33.333
Isopropyl myristate	1B	44	9.44
Aniline	1B	47.5	73.596



Table 2a. Determination of the optimal cutoff (%) for GHS sub-categorization by LLNA: BrdU-ELISA

Proposed Cutoff (%)	GHS sub-category			
	1A		1B	
	CORRECT	INCORRECT	CORRECT	INCORRECT
1	61.5% (8/13)	38.5% (5/13)	94.7% (18/19)	5.3% (1/19)
2	76.9% (10/13)	23.1% (3/13)	89.5% (17/19)	10.5% (2/19)
3	76.9% (10/13)	23.1% (3/13)	84.2% (16/19)	15.8% (3/19)
4	76.9% (10/13)	23.1% (3/13)	84.2% (16/19)	15.8% (3/19)
5	84.6% (11/13)	15.4% (2/13)	84.2% (16/19)	15.8% (3/19)
<b>6</b>	<b>92.3% (12/13)</b>	<b>7.7% (1/13)</b>	<b>84.2% (16/19)</b>	<b>15.8% (3/19)</b>
7	92.3% (12/13)	7.7% (1/13)	84.2% (16/19)	15.8% (3/19)
8	92.3% (12/13)	7.7% (1/13)	78.9% (15/19)	21.1% (4/19)
9	92.3% (12/13)	7.7% (1/13)	73.7% (14/19)	26.3% (5/19)
10	92.3% (12/13)	7.7% (1/13)	68.4% (13/19)	31.6% (6/19)

Bold type: Lower cutoff (%) showing the highest percentage of correct outcomes for GHS sub-categories 1A and 1B chemicals.

Table 2b. Determination of the optimal cutoff (%) for GHS sub-categorization by LLNA: BrdU-ELISA

Proposed Cutoff (%)	GHS sub-category			
	1A*		1B	
	CORRECT	INCORRECT	CORRECT	INCORRECT
6	100% (12/12)	0% (0/12)	84.2% (16/19)	15.8% (3/19)

\*The correct/incorrect outcomes (%) for GHS category 1A chemicals were calculated by excluding 2-mercaptobenzothiazole which may cause strain specific low response.

### 1-3 CBA/J マウスを用いた GHS 細区分基準の適用性検証

#### はじめに

1-3 では、1-2 で決定した最適な GHS 細区分の基準に関して、LLNA の推奨系統である CBA/J マウスを用いた LLNA : BrdU-ELISA の結果への適用性を GHS 細区分が既知な 15 種の物質を用いて評価した。

#### 材料と方法

##### 化学物質

試験に用いた化学物質と溶媒を Table 3 に示す。化学物質は LLNA performance standard (ICCVAM, 2009) に記載されており、次の LLNA-RI の GHS 細区分基準 (UN, 2019) に従って GHS 分類した。

GHS 区分 1A: EC3  $\leq$ 2%、GHS 区分 1B: EC3  $>$ 2%

EC3 値と細区分情報を Table 3 に示す。

##### 動物

健全な 8 週齢の CBA/J 雌マウスは Charles River Japan, Inc. (Kanagawa, Japan) から取得し、試験前に体重に応じて無作為に群分けを行った。すべての

マウスを、ポリカーボネートケージ(215W×320D×150H mm または 210W×320D×130H mm)に収容し、温度 23±2°C、相対湿度 55±15%に維持された動物室またはアイソレーターラック (Toyoriko Co., Ltd., Tokyo, Japan)にて飼育し、飼料(MF, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan)及び水道水を自由に摂取できるようにした。動物室及びアイソレーターラックは 10~15 サイクル/h の頻度で換気され、1 日 12 時間人工的に照明灯を点灯した。

すべてのマウスは、化学物質評価研究機構 (CERI) の定める動物実験規則 (2005年) に従って処置した。

### **LLNA:BrdU-ELISA**

各物質を、LLNA performance standard (ICCVAM,2009)に記載されている既知の EC3 値に従って、各物質について 2~3 濃度を選択して溶解液を調製し、3 日間連続してマウスの両耳介に 25µL ずつ適用した(0~2 日)。4 日目に、BrdU 溶液の単回腹腔内注射(注射あたり 5mg)を投与した。5 日目、マウスを屠殺し、耳介リンパ節を採取し、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)による分析まで 20°C で保存した。BrdU の組み込み率は ELISA の結果から測定した。ELISA は、市販の細胞増殖アッセイキット (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; Cat. no. 11647229001)を使用した。耳介リンパ節を 200 メッシュのステンレスメッ

シユ (SEMITEC Corp., Osaka, Japan) または細胞ストレーナー (Falcon 352350、Corning Inc., NY, USA) を用いて粉碎し、細胞を 15ml の生理食塩水に個別に懸濁した。細胞懸濁液 (100  $\mu$ l) を動物 1 匹分につき 96 ウェルマイクロプレート (Costar 3595; Corning Inc., NY, USA) 上の 3 つのウェルに加え、遠心分離 (3000g、10 分) 後、上清を取り除いて乾燥させ、その後 200  $\mu$ l の Fix-Denat 溶液を各ウェルに加え、プレートを室温で 30 分間放置し固定した。Fix-Denat 溶液を除去した後、抗 BrdU-POD 溶液 (100  $\mu$ l, Boehringer Mannheim Corp. or included in ELISA kit) を各ウェルに添加し 1 時間反応させた。次いで、各ウェルを PBS で 3 回洗浄し、tetramethylbenzidine を含む 100  $\mu$ l の基質溶液を加え、室温で約 15 分間反応させた。は、マイクロプレートリーダー (ARVO X4, Perkin Elmer, Inc. 940 Winter Street Waltham, MA 02451 USA もしくは FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) を用い、基準波長 492nm として 370 nm の吸光度で測定した。吸光度は BrdU 標識指数として定義した。刺激指数 (SI) は、各試験群の BrdU 標識指数を媒体対照群の BrdU 標識指数を除いて算出した。

## EC1.6 値

EC1.6 値は、以下の計算式を用いて算出した。Cobalt chloride に関しては、SI

値が全ての場合において 1.6 を超えたため、外挿された EC1.6 である EC1.6ex 値は計算式 B (Ryan *et al.*, 2007) を用いて計算した。

$$EC1.6 = c + \{(1.6-d) / (b-d)\} \times (a-c) \quad (\text{計算式 A})$$

$$EC1.6ex = 2^{\{\log_2 c + (1.6-d) (\log_2 a - \log_2 c) / (b-d)\}} \quad (\text{計算式 B})$$

計算式 A に関しては、1-3 と同様の計算式を用いた。

計算式 B は、SI 値が 1.6 より大きい最も低い濃度と次いで低い濃度の SI 値を使用した。より高い SI を有する点は (a,b) と、下側 SI を有する点はそれぞれ (c,d) と示した。

## GHS 細区分

試験化学物質は、1-2 で決定した下記の基準に従って、GHS 区分 1A または GHS 区分 1B に分類した。

細区分 1A:  $EC1.6 \leq 6\%$ , 細区分 1B:  $EC1.6 > 6\%$

次に、1-2 で決定した細区分基準に従って分類された GHS 区分 1A または GHS 区分 1B に正しく分類された化学物質の割合を、以下の式に従って計算した。

一致率 (%) = (LLNA: BrdU-ELISA に基づく各細区分の一致した物質数: /  
LLNA-RI に基づく各細区分の物質数) × 100

不一致率 (%) = (LLNA: BrdU-ELISA に基づく各細区分の一致した物質数: /  
LLNA-RI に基づく各細区分の物質数) × 100

### **EC3 と EC1.6 の相関解析**

LLNA-RI で得られた EC3 値及び LLNA:BrdU-ELISA で得られた EC1.6 値に関  
して、統計解析ソフトウェア (Graphpad PRISM version 6.02, Graphpad software  
Inc., CA, USA) を用いて相関解析を行った。

## 結果

### EC1.6 値

LLNA: BrdU-ELISA の結果に基づいて計算された EC1.6 値を Table 4 にまとめた。GHS 区分 1A の化学物質の EC1.6 値は 0.0095%から 5.03%、GHS 区分 1B の化学物質の値は 6.03%から 75%の範囲であった。

### GHS 細区分

LLNA-RI から算出された EC3 値によって分類される全 GHS 区分 1A の化学物質は、CBA/J マウスを用いて LLNA:BrdU-ELISA から算出された EC1.6 値によっても GHS 区分 1A に正しく分類された。また、全 GHS 区分 1B カテゴリー化学物質も GHS 区分 1B に正しく分類された。1-2 で決定した GHS 細区分の基準を CBA/J マウスを用いた LLNA:BrdU-ELISA の結果に適用することによって得られた一致率/不一致率を Table 5 に示す。1-2 で決定した GHS 細区分を用いて得られた結果は GHS 区分 1A および GHS 区分 1B の化学物質の両方について 100%であった。



### EC3 値と EC1.6 値の相関分析

算出された相関係数( $r$ )は 0.9076 ( $p < 0.0001$ ) として算出され、LLNA-RI で得られた EC3 値と、CBA/J マウスにおける LLNA:BrdU-ELISA にて算出された EC1.6 値との間に強い正の相関が示された (Fig. 8)。

### まとめ

CBA/J マウスを用いた LLNA :BrdU-ELISA から算出された EC1.6 値は、LLNA-RI 由来の EC3 値と相関しており、新たに提案する GHS 細区分基準は、CBA/J マウスを試験に使用した場合でも適切に機能することが確認された。

Table 3. Chemicals used in this study

Chemical name	CASRN	Manufacturer <sup>b</sup>	Purity (%)	Vehicle for BrdU-ELISA <sup>c</sup>	LLNA EC3 (%)	GHS Sub-category <sup>d</sup>
CMI <sup>a</sup> solution	26172-55-4	Fluka	1.3	DMF	0.009	1A
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Wako	100.0	AOO	0.049	1A
4-Phenylenediamine	106-50-3	TCI	>97	DMF	0.11	1A
Cobalt chloride	7646-79-9	Wako	99.5	DMSO	0.6	1A
Isoeugenol	97-54-1	Wako	99.1	AOO	1.5	1A
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	TCI	≥99.0	DMF	1.7	1A
Citral	5392-40-5	Wako	99.48	AOO	9.2	1B
Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	Wako	98.0	AOO	9.7	1B
Eugenol	97-53-0	TCI	99.3	AOO	10.1	1B
Phenyl benzoate	93-99-2	Wako	>99.0	AOO	13.6	1B
Cinnamic alcohol	104-54-1	Wako	>97	AOO	21	1B
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	MP Biomedicals	92.2	DMF	24	1B
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	Wako	99.3	MEK	28	1B
Methyl methacrylate	80-62-6	Sigma Aldrich	99	AOO	90	1B
Xylene	1330-20-7	Wako	85.2	AOO	95.8	1B

<sup>a</sup>5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one

<sup>b</sup>Fulka: Honeywell Fluka™, Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., TCI: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

<sup>c</sup>AOO: acetone-olive oil(4:1), DMF: *N,N*-dimethylformamide, MEK: methyl ethyl ketone, DMSO: dimethyl sulfoxide.

<sup>d</sup>The chemicals were allocated into GHS hazard sub-categories 1A or 1B according to the classification criterion, Category 1A: EC3 ≤2, Category 1B: EC3 >2, based on the known EC3 values cited in the LLNA performance standard (ICCVAM, 2009).

Table 4. The results of LLNA: BrdU-ELISA and GHS sub-categorization using newly proposed criterion.

Chemicals	LLNA: BrdU-ELISA		LLNA-RI	
	%Tested (SI value)	EC1.6	GHS sub-category	GHS sub-category
CMI <sup>a</sup> solution	0.005 (1.2), 0.05 (5.2)	0.0095	1A	1A
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.01 (1.1), 0.1 (3.5)	0.029	1A	1A
4-Phenylenediamine	0.05 (1.2), 0.3 (1.8)	0.22	1A	1A
Cobalt chloride	0.2 (2.3), 2 (4.7)	0.10*	1A	1A
Isoeugenol	1 (1.5), 10 (4.5)	1.3	1A	1A
2-Mercaptobenzothiazole	2.5 (1.5), 5 (1.6), 10 (2.2)	5.03	1A	1A
Citral	5 (1.1), 25 (2.6)	11.7	1B	1B
Hexyl cinnamic aldehyde	5 (1.3), 25 (4.2)	7.07	1B	1B
Eugenol	5 (1.4), 25 (5.3)	6.03	1B	1B
Phenyl benzoate	3 (1.4), 10 (1.1), 30 (1.8)	24.3	1B	1B
Cinnamic alcohol	10 (1.6), 50 (2.4)	10	1B	1B
Imidazolidinyl urea	5 (1.5), 25 (2.9)	6.43	1B	1B
Ethylene glycol dimethacrylate	10 (1.1), 50 (2.2)	28.18	1B	1B
Methyl methacrylate	25 (1.2), 100 (1.8)	75	1B	1B
Xylene	10 (1.1), 50 (1.7)	43.3	1B	1B

<sup>a</sup>5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one

\* EC1.6ex

Table 5. CORRECT/INCORRECT outcome (%) using newly proposed sub-categorization criterion for LLNA: BrdU-ELISA

GHS sub-category			
1A		1B	
CORRECT	INCORRECT	CORRECT	INCORRECT
100% (6/6)	0% (0/6)	100% (9/9)	0% (0/9)

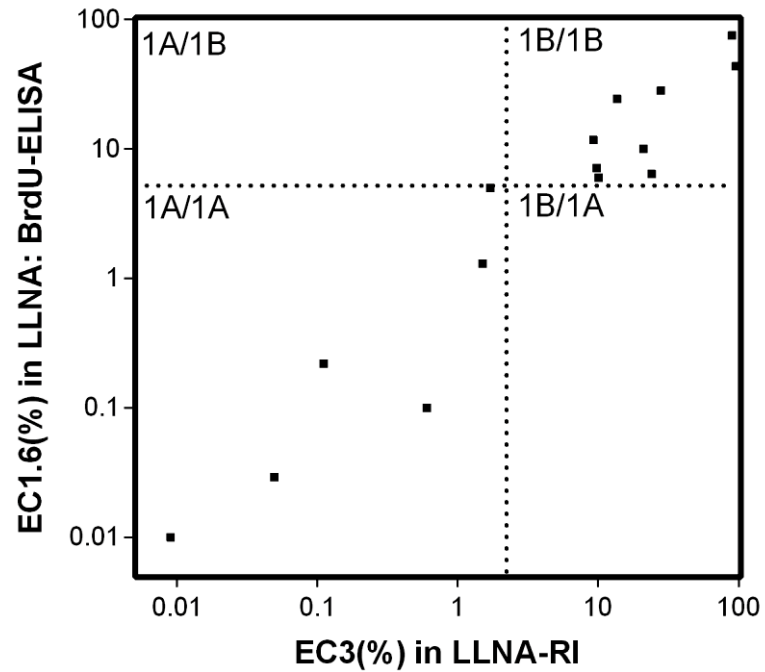


Fig. 8 Correlation between EC3 values obtained by the standard LLNA-RI and EC1.6 values obtained by LLNA: BrdU-ELISA ( $r=0.9076$ ,  $p<0.0001$ ). The dashed lines indicate cut-off values for sub-categorization by LLNA-RI and LLNA: BrdU-ELISA, and each separated field represents sub-category determined by LLNA-RI or LLNA: BrdU-ELISA.

#### 1-4 LLNA における感作性判定及び感作性強度のマウスの系統間比較

##### はじめに

LLNA では起源を同じくする CBA/J マウス及び CBA/Ca マウスの使用が推奨されている。両系統は 1920 年に Bagg アルビノマウスの雌と DBA マウスの雄との交配により生み出された。その後、両系統は分かれ、CBA/Ca マウスは 1947 年に Carter へ移管したマウスが起源となっている。一方 CBA/J マウスは 1948 年に Jackson Laboratory に移管されたものが起源となっている (The Jackson Laboratory, 2002)。長い期間の繁殖の繰り返しによってどちらの系統にもいくつかの遺伝子突然変異が生じており、CBA/J 及び CBA/Ca 間で皮膚移植ができなかったことが報告されている (Green *et al.*, 1965)。これらの遺伝子変異は LLNA のような毒性試験の結果において影響を与える可能性が考えられるが、現在までに LLNA における CBA/J マウスと CBA/Ca マウス間の定性的及び定量的な比較は報告例がない。

そこで我々は、これまでに LLNA における系統選択の指標とすべく、CBA/J マウス及び CBA/Ca マウスを用いて OECD TG429 に準拠した LLNA にて感作性既知の物質を同一条件で試験し、定性的及び定量的に系統間の比較を行ったので本節で報告する。

## 材料及び方法

### 実験動物

健康なCBA/J雌マウス (Charles River Laboratories Japan, INC., Kanagawa, Japan ) 及びCBA/Ca雌マウス (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) を無作為に群分けし、1群当たり4匹のマウスを用いた。

全てのマウスをポリカーボネートケージ(215W×320D×150H、mm)に収容し、温度 $23 \pm 2^{\circ}$  C、相対湿度 $55 \pm 15\%$ に保ったアイソレーターラック (Toyoriko Co., Ltd., Tokyo, Japan) 内で飼育した。飼育に使用したアイソレーターラックは毎日1時間あたり10～15サイクルで通気するように設定し、飼育室内は12時間ごとに照明を点灯した。

マウスは、飼料(MF, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan)及び水道水を自由に摂取できるようにし、試験には8～10週齢のものを使用した。すべてのマウスは、化学物質評価研究機構 (CERI) の定める動物実験規則 (2005年) に従って処置した。

## 化学物質

皮膚感作性の正確な評価のため、5種類のカテゴリーに分類して感作性強度を評価することが提案されている (Basketter *et al*, 2000)。

本研究では、強い感作性物質から非感作性物質に対する反応性を検証するため、異なる感作性強度、Human Allergy Class 1 (強度) から Human Allergy Class 5 (非感作性物質) にそれぞれ分類される5種の化学物質を用いた (Table 6)。

2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI) , Tokyo, Japan)、Isoeugenol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、 $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde (HCA, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、Propylene glycol (PG, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 及び Hexane (Kanto chemical CO., INC., Tokyo, Japan)。

Acetone (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)/Olive oil (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) mixture (4:1, v/v) (AOO) を全物質の溶媒として用いた。



## **LLNA**

LLNA は OECD テストガイドライン (TG) 429 (OECD, 2010) に従って実施した。試験液は、3 日間連続して各マウスの両耳介に塗布し、化学物質の最終塗布の 3 日後に 20  $\mu$ Ci の  $^3\text{H}$ -methyl thymidine (3H-TdR, Moravek Biochemicals, CA, USA) をマウスに尾静脈投与した。3H-TdR 投与から 5 時間後、マウスを安楽死させ、耳介リンパ節を採取した。

採取した耳介リンパ節から、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; MP Biomedicals, LLC., CA, USA) 中で 200 メッシュのステンレスメッシュを介した穏やかな分離を行い、リンパ節細胞 (LNCs) の細胞懸濁液を調製した。

LNC は、1mL の PBS 加え遠心分離により上清を除去する洗浄操作を実施し、同様の操作を 2 回繰り返した。次に、遠心分離によって上清の PBS を除去した後、1mL の 5% Trichloroacetic acid (TCA, Wako) をペレットに添加し、4° C で 18 時間インキュベートした。その後再度遠心分離にて上清を除去し、ペレットに TCA の 1mL を加えて再懸濁させ、10mL の液体シンチラント (Ecolume™, MP Biomedicals) に全量移して混和した。

各実験群のマウス 3H-TdR の取込量は、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3110TR, Perkin Elmer, Inc., MA, USA) を用いて Disintegrations Per Minute (DPM) を測定した。各マウスの DPM について、媒体対照群の平均 DPM で除

して刺激指数 (SI) を算出し、OECD TG429 に従い  $SI \geq 3$  を示した場合陽性とした。

### 統計解析

全試験群の DPM に関して CBA/J マウス及び CBA/Ca マウス間で Unpaired *t*-test ( $P < 0.05$ ) を用いて有意差検定を行った。

### EC3 の算出

LLNA 陽性であった化学物質については、SI 値が 3 となる用量 (EC3) を以下の式 (Ryan *et al.* 2007) を用いて算出した。

$$EC3 = c + \{(3 - d) / (b - d)\} \times (a - c)$$

ここで (a、b) および (c、d) は、LLNA の用量応答曲線上の SI 値 3 を上回る最小及び SI 値 3 を下回る最大に位置する (用量、SI) をそれぞれ表す。

## 結果

### **3H-TdR 取込量**

両系統の基本的な違いを調べるため、両系統の媒体対照群の DPM の平均±標準誤差 (SE) を算出した。CBA/J マウス及び CBA/Ca マウスの DPM (平均値±SE) は、それぞれ  $487 \pm 56$  (N=20) 及び  $1202 \pm 66$  (N=8) となり (Fig.9)、両系統間で有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。

次に、各化学物質の塗布群の個別の DPM 値を Fig. 10 に示した。CBA/J マウスの各物質の DPM 値 (平均値±SE) は、DNCB:  $652 \pm 108$  (0.016%)、 $2979 \pm 211$  (0.08%) 及び  $21536 \pm 1281$  (0.4%)、Isoeugenol:  $793 \pm 194$  (0.4%)、 $1735 \pm 227$  (2%) 及び  $15622 \pm 2945$  (10%)、HCA:  $378 \pm 38$  (2.5%)、 $1408 \pm 360$  (10%) 及び  $2464 \pm 567$  (25%)、PG:  $562 \pm 86$  (2%)、 $499 \pm 56$  (10%) 及び  $220 \pm 36$  (50%)、Hexane:  $674 \pm 162$  (25%)、 $770 \pm 51$  (50%) 及び  $1787 \pm 185$  (100%) となった。

CBA/Ca マウスの各物質の DPM 値 (平均値±SE) は、DNCB:  $1610 \pm 166$  (0.016%)、 $8536 \pm 954$  (0.08%)、及び  $32022 \pm 1071$  (0.4%)、Isoeugenol:  $3041 \pm 603$  (0.4%)、 $5016 \pm 802$  (2%) 及び  $22718 \pm 4492$  (10%)、HCA:  $2111 \pm 249$  (2.5%)、 $5359 \pm 364$  (10%) 及び  $11161 \pm 2206$  (25%)、PG:  $1635 \pm 382$  (2%)、 $1554 \pm 236$  (10%) 及び  $1115 \pm 240$  (50%)、Hexane:  $1531 \pm 239$  (25%)、 $1587 \pm 148$  (50%) 及び  $1889 \pm 458$  (100%) となり、Hexane 100%群以外の試験群で有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。

## **LLNA**

SI値及びEC3値に関してTable 7に示す。

CBA/Jマウスの各物質のSI 値(平均値 ± SE) は、DNCB:1.3 ± 0.2 (0.016%)、5.9 ± 0.4 (0.08%) 及び42.7 ± 2.5 (0.4%)、Isoeugenol:1.7 ± 0.4 (0.4%)、3.7 ± 0.5 (2%) 及び33.5 ± 6.3 (10%)、HCA:1.0 ± 0.1 (2.5%)、3.9 ± 1.0 (10%) 及び6.8 ± 1.6 (25%)、PG :1.9 ± 0.2 (2%)、1.7 ± 0.2 (10%) 及び0.7 ± 0.1 (50%)、Hexane:0.8 ± 0.2 (25%)、1.0 ± 0.1 (50%) 及び2.2 ± 0.2 (100%) と算出された。

したがって、DNCB、Isoeugenol及びHCAは陽性と判定され、PG及びHexaneは陰性と判定された。

CBA/Caマウスの各物質のSI 値(平均値 ± SE)は、DNCB:1.4 ± 0.2 (0.016%)、7.4 ± 0.8 (0.08%) 及び27.4 ± 0.9 (0.4%)、Isoeugenol:2.5 ± 0.5 (0.4%)、4.1 ± 0.7 (2%) 及び18.7 ± 3.7 (10%)、HCA:1.7 ± 0.2 (2.5%)、4.4 ± 0.3 (10%) 及び9.2 ± 1.8 (25%)、PG:1.3 ± 0.3 (2%)、1.3 ± 0.2 (10%) 及び0.9 ± 0.2 (50%)、Hexane:1.3 ± 0.3 (25%)、1.3 ± 0.1 (50%) 及び1.8 ± 0.6 (100%) と算出された。

したがって、CBA/Caを用いたLLNAにおいてもDNCB、Isoeugenol及びHCAは陽性と判定され、PG及びHexaneは陰性と判定された。

### **EC3の算出**

陽性と判定されたDNCB、Isoeugenol及びHCA の各物質のCBA/Jマウスを用いたLLNAで得られたEC3はそれぞれ0.04、1.4及び7.7と算出され、CBA/Caマウスを用いたLLNAで得られたEC3はそれぞれ0.03、0.9及び6.0と算出された。

**Table 6 Chemicals used in this study and their human allergy classes**

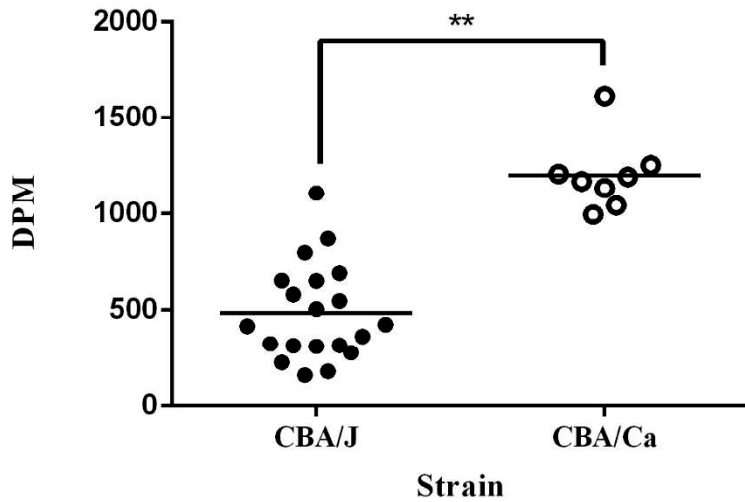
Chemical	Supplier	CAS	Lot No.	Human Allergy Class*
2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)	TCI	97-00-7	JXPYL-KE	1
Isoeugenol	Wako	97-54-1	ALR3319	2
$\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde (HCA)	Wako	101-86-0	LAP0946	3
Propyleneglycol (PG)	Wako	57-55-6	TSJ4048	4
Hexane (Hex)	KANTO CHEMICAL	110-54-3	411U1893	5

\* Human Allergy Class reported by Basketter, D.A. *et al*, (2000).

**Table 7 Summary of the results in LLNA using CBA/J and CBA/Ca mice**

Group	% tested	N	Stimulation index (SI)						EC3(%)	
			CBA/J			CBA/Ca			CBA/J	CBA/Ca
			Mean	SE	P/N*	Mean	SE	P/N*		
AOO	-	4	1.0	0.2	-	1.0	0.1	-	-	
DNCB	0.016%	4	1.3	0.2		1.4	0.2			
	0.08%	4	5.9	0.4	P	7.4	0.8	P	0.04 0.034	
	0.4%	4	42.7	2.5		27.4	0.9			
Isoeugenol	0.4%	4	1.7	0.4		2.5	0.5			
	2%	4	3.7	0.5	P	4.1	0.7	P	1.4 0.9	
	10%	4	33.5	6.3		18.7	3.7			
HCA	2.5%	4	1.0	0.1		1.7	0.2			
	10%	4	3.9	1.0	P	4.4	0.3	P	7.7 6	
	25%	4	6.8	1.6		9.2	1.8			
PG	2%	4	1.9	0.2		1.3	0.3			
	10%	4	1.7	0.2	N	1.3	0.2	N	- -	
	50%	4	0.7	0.1		0.9	0.2			
Hex	25%	4	0.8	0.2		1.3	0.3			
	50%	4	1.0	0.1	N	1.3	0.1	N	- -	
	100%	4	2.2	0.2		1.8	0.6			

P:Positive, N: Negative



**Fig. 9 DPM values in vehicle control groups (AOO) in local lymph node assay.**

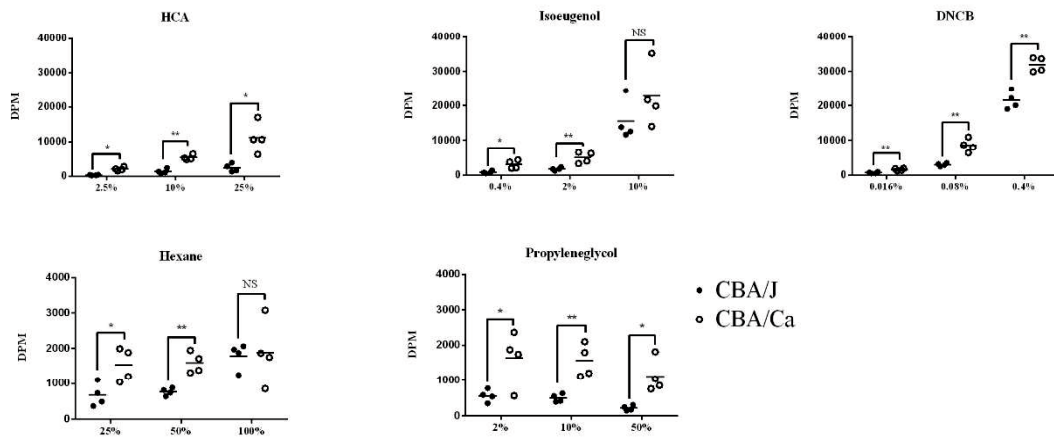
Data are represented as individual DPM values in each vehicle control group with CBA/J (N=20) or CBA/Ca (N=8).

The horizontal bar shows Mean DPM value of each groups.

DPM: Disintegration per minute, AOO (acetone/olive oil mixture=4:1 (v/v))

\*\* :  $P < 0.01$  (Un-paired *t*-test)





**Fig. 10 DPM values in chemical treated groups in local lymph node assay.**

Data are represented as individual DPM values in each chemical treated group with CBA/J (N=4) or CBA/Ca (N=4).

The horizontal bar shows Mean DPM value of each group.

DPM: Disintegration per minute, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , NS: not significant (Un-paired *t*-test)

## まとめ

LLNA では、使用する動物として CBA/J マウス及び CBA/Ca マウスが推奨されている。しかしながら、CBA/J マウス及び CBA/Ca マウスは起源を同じくしているものの、1947 年もしくは 1948 年に分岐しており、そのため両系統においていくつかの遺伝子突然変異が生じていた。このような遺伝子突然変異は LLNA のような毒性試験においては試験結果に影響を及ぼす可能性がある。近年、LLNA 及び LLNA:BrdU-ELISA において、いくつかのマウスの系統間で定性的及び定量的な評価結果における反応性の違いや (Woolhiser *et al.*, 2000; Takeyoshi *et al.*, 2004; Takeyoshi *et al.*, 2006)、CBA/Ca マウスの亜系である CBA/CaOlaHsd マウス及び CBA/CaHsdRcc マウス間の LLNA における定性的及び定量的な評価結果における反応性の違いが報告されている (Anzai *et al.*, 2010)。しかしながら、OECD TG429 にて使用が推奨されている CBA/J マウス及び CBA/Ca マウスに関しては、定性的及び定量的な評価結果を比較した報告はない。

そこで我々は、皮膚感作性試験を実施する際の系統選択に有益な情報を得るため、CBA/J マウス及び CBA/Ca マウスを用いて OECD TG429 に準拠した LLNA にて感作性既知の物質を同一条件で試験し、定性的及び定量的に系統間の比較を行った。

本研究では、まず媒体対照群のDPMを比較したところ、CBA/CaマウスのDPMはCBA/JマウスのDPMよりも有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。この違いは3H-TdRの取り込みもしくは代謝の違いによって生じる系統固有のものであると考えられた。それゆえ、各被験物質のCBA/Caマウスから得られたDPMはHexaneの100%群以外の試験群にてCBA/Jマウスから得られたDPMよりも有意に高い値を示した。皮膚感作性判定に用いるSI値に関しては、DNCB及びIsoeugenolの高用量群を除きほとんど近い値を示した。このことは、LLNAで採用されている媒体対照群の結果を用いて標準化するSI値を用いることにより、両系統の遺伝的な違いを解消できていることを示している。

本研究で得られた最終的な結果、すなわち感作性判定及び感作性強度に関しては、両系統とも全物質陽性/陰性の感作性判定は一致し、EC3値に関しても両系統全物質ほぼ同じ値を示し、どちらもInteragency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Performance Standards for LLNA (ICCVAM, 2009) に示されているEC3値の範囲内であった。

加えて、本研究で用いた物質は異なる感作性強度、Human Allergy Class 1から5の物質をそれぞれ用いているが、両系統共に同様の感作性強度に分類することができた。

結論として、両系統間には3H-TdRの取込み量に違いはあるものの、LLNAにて得られるSI値及びEC3値に関しては系統間で差はなかった。

## 1-4 小括

化学物質の分類およびラベリングの Globally Harmonized System (GHS) は、化学物質によって引き起こされる事故を防ぐための危険分類およびリスクコミュニケーションツールとして広く使用されている。皮膚感作性は GHS の重要な危険有害性クラスの 1 つであり、利用可能な実験データが細区分基準を満たさない場合、皮膚感作性物質は区分 1 に分類される。区分 1A/1B といった細区分に関しては、現在 OECD TG406 であるモルモットの maximization test / Buehler test、及び OECD TG429 である LLNA-RI で分類可能となっている。

LLNA : BrdU-ELISA は 2010 年に OECD TG442B として承認されたが、細区分の基準がこれまで提案されていないため、この試験方法は GHS 細区分にはまだ適用できない。

そこで本研究では、LLNA : BrdU-ELISA のピアレビュープロセスで使用されている既存のデータを再解析し、本法による GHS 細区分のための最適な基準の決定を試み、現在 LLNA で広く利用されている CBA/J マウスを用いた LLNA : BrdU-ELISA でも機能するか検証した。

LLNA : BrdU-ELISA のピアレビュープロセスで使用された 32 の皮膚感作性物質を選択し、LLNA : BrdU-ELISA によって算出された EC1.6 を用い、1% から 10% の暫定カットオフ値を設定し得られた各細区分結果及び報告された EC3

値に基づいた GHS 細区分結果と比較した一致数/非一致数の割合を計算した。

その結果、EC1.6 カットオフ値 6%もしくは 7%の場合、13 種の GHS 区分 1A 感作性物質のうち 12 種が一致し、19 種の GHS 区分 1B 感作性物質のうち 16 種が一致した。各細区分の一致率は、GHS 区分 1A が 92.3%、GHS 区分 1B が 84.2%と算出された。そのため、安全性の観点から 7%よりも小さい値である 6%を最適カットオフ値と決定した。

本研究では、LLNA-RI によって GHS 区分 1A に分類された化学物質である 2-Mercaptbenzothiazole のみが区分 1B と分類された。2-Mercaptbenzothiazole の誤った分類は、CBA/JN マウスを使用した実験から得られた EC1.6 値に基づいていた。2-Mercaptbenzothiazole の EC 値が高くなることは、LLNA : DA のピアレビューレポートにも記載されており、LLNA : BrdU-ELISA 及び LLNA : DA のバリデーション試験ではどちらも CBA/JN マウスが実験動物として使用されていた。同文献では 2-Mercaptbenzothiazole の EC 値が高いのは、CBA/JN マウスの系統特異的反応が原因である可能性が示唆されている (ICCVAM、2010b)。ICCVAM report に記載されている 2-Mercaptbenzothiazole の EC3 値 (EC3=1.7) の算出には CBA/Ca マウスが用いられている (Basketter *et al.* 1993)。一方で Och *et al.* (2000) は BALB/c マウスを用いた LLNA-RI にて 2-Mercaptbenzothiazole の EC3 値を 9.669 と報告しており、この値を用いて GHS

細区分の分類をすると GHS 区分 1B となる。さらに、我々は CBA/J マウスを用いた LLNA: BrdU-ELISA によって EC1.6=5.0 という結果を得ており、この値を用いると我々の提案する新基準においては GHS 区分 1A と分類できる。これらのデータは、2- Mercaptbenzothiazole が LLNA において系統間差が生じることを示唆している。そのため、系統特異的に低反応であった 2- Mercaptbenzothiazole を除くと、GHS 区分 1A 化学物質の一致率は 100%となった (Table1 2b)。

3 種の GHS 区分 1B 化学物質 3- aminophenol、Trimellitic anhydride 及び Nickel sulfate が GHS 区分 1A と一致しない分類となった。

3- aminophenol の GHS 区分 1B の細区分分類は、LLNA-RI の EC3 値 (EC3=3.2) に基づいており、LLNA-RI のカットオフに近い値であった。したがって、3- aminophenol は細区分の境界の化学物質と考えられた。Trimellitic anhydride の GHS 細区分分類は LLNA-RI の EC3 値 (EC3=9.2) を用いて決定された。しかしながら、Trimellitic anhydride の EC3 値に関しては 0.22 (Kimber et al. 2003) 及び 0.20 (Fukuyama *et al.* 2011) という報告もある。これらのことから、Trimellitic anhydride は GHS 区分 1B よりも GHS 区分 1A とみなすべきと考えられ、LLNA: BrdU-ELISA による細区分は正しいと考えられた。

一方、LLNA-RI の結果に基づいて GHS 区分 1B と分類された Nickel sulfate は LLNA : BrdU-ELISA において GHS 区分 1A と分類された。LLNA-RI 及び

LLNA: BrdU-ELISA で使用された溶媒はどちらも DMSO であり、溶媒の違いによるものではないと考えられた。LLNA: BrdU-ELISA のバリデーションで得られた EC1.6 はそれぞれ 1.84, 0.57 及び 0.67 と算出され、平均±標準偏差は 1.03 ± 0.70 であったことから (ICCVAM 2010a)、Nickel sulfate に対する高い反応性は、使用する実験動物の系統差など試験法に特異的な特徴であると考えられた。

Ha *et al.* (2017) は EC1.6 及びカットオフ値 2%の基準を用い、LLNA:BrdU-ELISA を用いた GHS 細区分を試み、GHS 区分 1A に分類された化学物質の一致率は 67.0%と報告している。一方、我々の提案する新しい基準を用いると、32 種類の化学物質における区分 1A の一致率は 92.7%となり、2-Mercaptbenzothiazole を除いた 31 物質では一致率は 100%となった。化学物質の安全な取り扱いのために皮膚感作性区分 1A を正しく分類することが非常に重要であるため、我々が新たに提案する LLNA : BrdU-ELISA の GHS 細区分の基準は、実用に有望であることが示唆された。

次に、LLNA に広く用いられている CBA/J マウスを用いて得られたデータに適用可能性を検証した。LLNA-RI の Performance Standard (ICCVAM, 2009) に記載されている GHS 区分 1A または GHS 区分 1B に分類される 15 の化学物質を試験した。すべての化学物質は陽性となり、EC1.6 値を算出した。Cobalt



chloride に関しては、全用量で SI 値が 1.6 を上回ったため、外挿値 EC1.6ex 値を算出した。算出された値は 0.10% であり、試験した最も低い用量 (0.2%) に近いいため、外挿値は信頼できると考えられた。さらに、Cobalt chloride の SI 値は 0.2% (SI=2.3) で明らかに 1.6 を超えており、Cobalt chloride は GHS 区分 1A と区分される可能性があることが示唆された。

LLNA-RI にて算出された EC3 値に従って区分された GHS 区分 1A または GHS 区分 1B の化学物質を CBA/J マウスを用いた LLNA:BrdU-ELISA によって細区分した結果、GHS 区分 1A 及び GHS 区分 1B の化学物質の両方について一致率は 100% であった。

さらに、報告された EC3 値と CBA/J マウスを用いた LLNA: BrdU-ELISA から算出される EC1.6 値との相関の分析の結果、強い正の相関があることを明らかにした ( $r=0.9076$ ,  $p<0.0001$ , Fig. 8)。したがって、LLNA:BrdU-ELISA から導出された EC1.6 値は、LLNA-RI から算出された EC3 値と同様に使用することができ、本研究で提案された基準は、CBA/J マウスを用いて GHS 細区分の目的で行われた試験において機能することが確認された。

CBA/J マウス以外の系統のマウスへの基準の適用性に関しては、TG429 の LLNA の推奨系統である CBA/Ca マウスも広く使用されており、CBA/J マウスを用いた LLNA-RI 及び CBA/Ca マウスを用いた LLNA-RI から得られる結果

は、生データとなる 3H-TdR の取込み量に違いは生じるものの、SI 値や EC 値といった LLNA-RI で最終的に得られる結果はほぼ同等であり、系統間に差がないことが分かった。LLNA:BrdU-ELISA の原理は LLNA-RI と同じであることから、本研究により見いだされた基準は CBA/Ca マウスにも適用可能であると考えられた。

以上のことから、LLNA:BrdU-ELISA の新たに設定した GHS 細区分基準（GHS 区分 1A:EC1.6 $\leq$ 6%、GHS 区分 1B:EC1.6 $>$ 6%）は、CBA/J マウス及び CBA/Ca マウスを用いた LLNA:BrdU-ELISA においても機能することが確認でき、GHS 細区分に適用可能であり、実用可能であると考えられた。

## 第2章 新規光アレルギー性評価法の開発

### 2-1 小序

光アレルギー性皮膚炎は、光アレルギー性物質を経口投与または皮膚に塗布し、その後紫外線に曝されたときに生じる IV 型アレルギー反応のことである。光アレルギー性は主に皮膚適用後の化粧品および医薬品によって引き起こされる場合があるため、ヒトにとって非常に重要な健康問題である。

経皮適用される化学物質の光アレルギー性を予測するために、Adjuvant and Strip 法(Sato *et al.* 1980)及び Herber 法(Herber 1969)のようなモルモット予測法が一般的に用いられている。マウスを用いた予測方法の開発も試みられており、光アレルギー応答の惹起相における耳の厚さの変化(Gerberick *et al.* 1990a、1990b)および皮膚中のリンパ節細胞におけるサイトカイン放出を指標とした改変 Local Lymph Node Assay (LLNA) (Ulrich *et al.* 1998)などが報告されている。

しかし、実験動物を用いたこれらの既存の光アレルギー性試験法は、惹起相の皮膚反応を評価するため、比較的多くの動物と長い実験期間を必要があった。

さらに、ICH ガイドライン S10 (2013)では、これらの既存の光アレルギー性試験法は、ヒトに対して予測可能性が未知であり、公式なバリデーションも実施

されていないため、経皮暴露される光アレルギー性物質を予測に用いることは推奨されないとされている。

このため、化学物質の光アレルギー性の評価は、ヒトの健康にとって重要なものの、化学物質の安全性評価戦略において光アレルギー性の効果的な予測方法はない。従って、試験期間が短く、動物愛護に配慮した信頼性の高い光アレルギー性試験法が必要である。

そこで本研究では、経皮ばく露される化学物質の皮膚感作性試験法として信頼性の高い LLNA を応用し、短期間かつ動物愛護に優れ、化学物質の光アレルギー性を高精度に検出可能な信頼性の高い新規光安全性評価法の開発を試みた。

## 2-2 LLNA を応用した新規光アレルギー性試験法の開発と予測精度の検証

### 材料と方法

#### 実験動物

健康なCBA/Ca雌マウス (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) を無作為に群分けし、皮膚光毒性評価に1群につき2匹のマウスを用い、皮膚感作性評価及び光アレルギー性評価に1群当たり4匹のマウスを用いた。

全てのマウスをポリカーボネートケージ (215W×320D×150H、mm) に収容し、温度 $23 \pm 2^{\circ}$  C、相対湿度 $55 \pm 15\%$ に保ったアイソレーターラック (Toyoriko Co., Ltd., Tokyo, Japan) 内で飼育した。飼育に使用したアイソレーターラックは毎日1時間あたり10~15サイクルで通気するように設定し、飼育室内は12時間ごとに照明を点灯した。

マウスは、飼料 (MF, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) 及び水道水を自由に摂取できるようにし、試験には8~10週齢のものを使用した。

すべてのマウスは、化学物質評価研究機構 (CERI) の定める動物実験規則 (2005年) に従って処置した。

## 化学物質

本研究では、光アレルギー性物質として知られる7つの化学物質及び6つの光アレルギー性陰性の化学物質からなる合計13の化学物質を使用した (Table 8)。

Ketoprofen (Cardoso *et al.* 2009, Tokura 2009, EMCPPPTS Taskforce. 2012, Onoue *et al.*2017)、 piroxicam (Cardoso *et al.* 2009, Tokura 2009, EMCPPPTS Taskforce. 2012, Onoue *et al.*2017)、 doxycycline hydrochloride (Tokura 2009, Onoue *et al.*2017)、 promethazine hydrochloride (Cardoso *et al.* 2009, Scalf *et al.* 2009, Tokura 2009, Onoue *et al.*2017), 8-methoxypsoralen (Bonamonte *et al.*2010, Onoue *et al.*2017)、 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide (Matsuo *et al.*2002, Scalf *et al.* 2009, Gao *et al.* 2014) 及び chlorpromazine hydrochloride (Scalf *et al.* 2009, Tokura 2009, Gao *et al.* 2014, Onoue *et al.*2017) の7物質は、ヒトに対する光アレルギー性の情報が豊富にあるため、陽性物質として選択した。

Ethanol, propyleneglycol, 1,3-butyleneglycol, 2-propanol, 2-ethylhexyl methacrylate and minocycline hydrochlorideの6物質は、UV吸収がなく、ヒトの光アレルギー性の情報を有しないため、光アレルギー性陰性と想定される物質として選択した。Minocycline hydrochlorideも、UV吸収を有するにもかかわらず光アレルギー性の情報がないため (Tokura *et al.* 2001)、光アレルギー性陰性と想定される

物質として使用した。

本研究で使用した溶媒については、Methanol (MeOH; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) をステップ1のモル吸光係数の算出で溶媒として使用した。他のステップの溶媒として、*N, N*-Dimethylformamide (DMF; Wako)、70% Ethanol (EtOH; Wako, 水:EtOH = 3:7) 及びMethylethyl ketone (MEK; Wako) の3種の物質を、UVAの吸収を有しないため溶媒として使用した。

## *UV 光源*

平行に設置した6本のブラックライト（FL40S BLB, Toshiba Corporation, Tokyo, Japan）を用いた照射装置を作製して光源として使用し、350~355nmの極大波長を有するUVA（320~400nm）を照射した。なお、動物に照射する際には、UVB範囲の光を最小限に抑えるためにガラスフィルターを使用した。

本研究では、UVBの影響を回避し、取り扱い手順を簡便化するために、UVA照射方法を選択した。



### ステップ1: UV 吸収

光アレルギー評価のためのフロー図をFig.11に示す。

まず、290~400nmの波長範囲内のUV吸収スペクトルを分光光度計（BioSpec mini, Shimadzu, Kyoto, Japan）を用いて測定した。

次に、各化学物質のモル吸光係数( $\epsilon$ )を次の式を用いて計算した:

$$\epsilon = A/(c \times l) \quad (\text{A:吸光度;c:濃度;l:光路長})$$

ICH S10の基準に従い、モル吸光係数が $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ より大きい場合UV吸収陽性とし、さらにステップ2に供した。一方、 $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ より小さい場合は、UV吸収陰性とした。

本研究では、UV吸収陰性となった物質を含むすべての化学物質について、各ステップの有効性を確認するため、3つのステップすべてを用いて評価した。

## ステップ2: LLNAをベースとした皮膚の光毒性評価

LLNAはOECDテストガイドライン(TG)429(OECD2010)に従って実施した。最大用量は、OECD TG429で定められている予備試験試験の結果から全身毒性および皮膚一次刺激の有無を決定した。

その結果、EtOH、PG、1,3-BG、IPA、2-EHMA、KP、Px、DOC、MIC、PMZ、8-MOP、TCSA、CPZの最大用量(%)はそれぞれ100、100、100、100、100、100、100、100、25、10、0.02と決定した。

試験液は、3日間連続して各マウスの両耳介に塗布し、化学物質の最終塗布の3日後に20 $\mu$ Ciの<sup>3</sup>H-methyl thymidine(3H-TdR, Moravek Biochemicals, CA, USA)をマウスに尾静脈投与した。3H-TdR投与から5時間後、マウスを安楽死させ、耳介リンパ節を採取した。

採取した耳介リンパ節から、リン酸緩衝生理食塩水(PBS; MP Biomedicals, LLC., CA, USA)中で200メッシュのステンレスメッシュを介した穏やかな分離を行い、リンパ節細胞(LNCs)の細胞懸濁液を調製した。

LNCは、1mLのPBS加え遠心分離により上清を除去する洗浄操作を実施し、同様の操作を2回繰り返した。次に、遠心分離によって上清のPBSを除去した後、1mLの5% Trichloroacetic acid (TCA, Wako)をペレットに添加し、4°Cで18時間インキュベートした。その後再度遠心分離にて上清を除去し、ペレット

に TCA の 1mL を加えて再懸濁させ、10mL の液体シンチラント (Ecolume™, MP Biomedicals) に全量移して混和した。

各実験群のマウス 3H-TdR の取込量は、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3110TR, Perkin Elmer, Inc., MA, USA) を用いて Disintegrations Per Minute (DPM) を測定した。各マウスの DPM について、媒体対照群の平均 DPM で除して刺激指数 (SI) を算出し、OECD TG429 に従い  $SI \geq 3$  を示した場合陽性とした。

LLNA 陽性であった化学物質については、SI 値が 3 となる用量 (EC3) を以下の式 (Ryan *et al.* 2007) を用いて算出した。

$$EC3 = c + \{(3 - d) / (b - d)\} \times (a - c)$$

ここで (a、b) および (c、d) は、LLNA の用量応答曲線上の SI 値 3 を上回る最小及び SI 値 3 を下回る最大に位置する (用量、SI) をそれぞれ表す。

皮膚光毒性評価に用いる最大濃度は LLNA で陽性となった物質に関しては EC3 値、陰性となった物質は試験可能な最大濃度を選択した。

化学物質をマウス両耳介に塗布し、続いて照射装置を用いて  $10J/cm^2$  の UVA をマウスに照射した。同様の処置を 3 日間連続して繰り返した。

皮膚光毒性を、0日目および6日後の耳介厚さと体重を測定して評価した。試験0日の値と比較して5%以上の体重減少または耳介厚さが25%以上の増加を示した場合、皮膚光毒性陽性とした。

### ステップ3: 光アレルギー性評価

まずマウスを、UV 照射 (UV+) と非 UV 照射 (UV-) の 2 つの試験群に分けた。

各化学物質の試験濃度は、ステップ 2 で算出した皮膚感作性および皮膚光毒性に対する最大無毒性量 (NOAEL) を用いた。

化学物質は両方の試験群のマウスの両耳介に塗布し、UV+群のマウスはステップ 2 と同様の方法で UVA を 3 日間連続して照射した。UV-群のマウスは、UV 照射を除いて同様の処置をした。3H-TdR 投与およびその後の処置は LLNA に従った。

光アレルギー性の評価には光刺激指数 (pSI) を用いた。pSI 値は化学物質投与群の平均 DPM を媒体対照群の平均 DPM で除することで、UV+群および UV-群においてそれぞれ算出した。各化学物質の UV+群と UV-群の pSI 値を unpaired *t*-test にて有意差検定した ( $p < 0.05$ )。群間に有意な差が生じた場合光アレルギー性陽性とした。

## 結果

### ステップ1: UV 吸収

UV 吸収の結果を Table 9 に示す。5 種の化学物質 (EtOH、PG、1,3-BG、IPA 及び 2-EHMA) が、試験したすべての波長でモル吸光係数が  $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を下回ったため、UV 吸収は有さないと判定された。

その他の 8 種の化学物質 (KP、Px、DOC、MIC、PMZ、8-MOP、TCSA、および CPZ) は、極大を示す波長域でモル吸光係数が 2200、20540、13490、12910、6570、13700、8260、及び 4860 と算出され、モル吸光係数が  $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を上回ったため UV 吸収を有すると判定された。

## ステップ2: 皮膚光毒性

LLNA の結果を Table 10 に示す。4 種の化学物質(2-EHMA、Px、TCSA、及び CPZ)が皮膚感作性陽性と判定され、EC3 (%) 値はそれぞれ 6.5、0.7、0.006、及び 2.4 と算出された。他 9 種の化学物質は、皮膚感作陰性と判定された。

皮膚光毒性評価の結果を Table 10 に示す。DOC、PMZ、8-MOP、及び CPZ を塗布したそれぞれの UV+群のマウスの耳介厚さは、試験 0 日と比較して約 25% 増加した。したがって、これら 4 種の化学物質は光毒性陽性と判定された。これらの化学物質の NOAELs (%) はそれぞれ 5、25、0.025、0.1 であった。残りの 9 種の化学物質は、マウスの耳介厚さ、紅斑、および一般状態に変化がなかったため皮膚光毒性陰性と判定された。

### ステップ3: 光アレルギー性

結果をTable 11に示す。各物質のUV-群及びUV+群のpSI値は、KP (1.0%) は $2.4 \pm 0.2$ 及び $4.1 \pm 0.4$ 、Px (0.25%) は $1.8 \pm 0.2$ 及び $3.6 \pm 0.6$ 、DOC (5.0%) は $1.9 \pm 0.1$ 及び $3.0 \pm 0.4$ 、PMZ (25%) は $1.3 \pm 0.2$ 及び $12.7 \pm 2.0$ 、8-MOP (0.025%) は $1.4 \pm 0.1$ 及び $3.9 \pm 0.6$ 、TCSA (0.006%) は $1.6 \pm 0.3$ 及び $3.5 \pm 0.3$ 、CPZ (0.1%) は $1.3 \pm 0.2$ 及び $13.3 \pm 2.3$ とそれぞれ算出された。他の物質は顕著な違いを示さなかった。

7種の化学物質処置群(KP、Px、DOC、PMZ、8-MOP、TCSA、およびCPZ)で有意差( $p < 0.05$ )が認められたが、残りの6種の化学物質処置群では有意な差は認められなかった。以上のことから、7種の化学物質(KP、Px、DOC、PMZ、8-MOP、TCSA、およびCPZ)が光アレルギー性陽性と判定され、他の6種の物質は光アレルギー性陰性と判定された。



Table 8. Chemicals used in this study and photoallergy information

	Abbreviation	Supplier	CASRN	Photoallergy information	References
Ethanol	EtOH	Wako	64-17-5	EN	-
Propyleneglycol	PG	Wako	57-55-6	EN	-
1,3-Butyleneglycol	1,3-BG	TCI	107-88-0	EN	-
2-Propanol	IPA	Wako	67-63-0	EN	-
2-Ethylhexyl Methacrylate	2-EHMA	Wako	688-84-6	EN	-
Ketoprofen	KP	Wako	22071-15-4	P	1), 2), 3), 4)
Piroxicam	Px	TCI	36322-90-4	P	1), 2), 3), 4)
Doxycycline Hydrochloride	DOC	MP Biomedicals, LLC	10592-13-9	P	2), 4)
Minocycline Hydrochloride	MIC	TCI	13614-98-7	EN	5)
Promethazine Hydrochloride	PMZ	TCI	58-33-3	P	1), 2), 4), 6)
8-Methoxypsoralen	8-MOP	Sigma-Aldrich Co. LLC	298-81-7	P	4), 7)
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	TCSA	Kanto chemical	40743-51	P	6), 8), 9)
Chlorpromazine Hydrochloride	CPZ	TCI	69-09-0	P	2), 4), 6), 9)

EN: Excepted Negative, P: Positive, -: No information, TCI: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

1) Cardoso *et al.* 2009, 2) Tokura 2009, 3) The European Multicentre Photopatch Test Study Taskforce. 2012, 4) Onoue *et al.* 2017, 5) Tokura *et al.* 2001, 6) Scalf *et al.* 2009, 7) Bonamonte *et al.* 2010, 8) Matsuo *et al.* 2002, 9) Gao *et al.* 2014.

Table 9. Results of Step 1: UV absorption analysis

Chemicals	UV absorption analysis		
	$\lambda_{\max}$ (nm)	MEC ( $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	P/N
Ethanol	–	–	N
Propyleneglycol	–	–	N
1,3-butyleneglycol	–	–	N
2-propanol	–	–	N
2-ethylhexyl Methacrylate	–	–	N
Ketoprofen	290	2200	P
Piroxicam	325	20540	P
Doxycycline hydrochloride	350	13490	P
Minocycline hydrochloride	340	12910	P
Promethazine hydrochloride	300	6570	P
8-methoxypsoralen	299	13700	P
3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide	325	8260	P
Chlorpromazine hydrochloride	308	4860	P

MEC: molar extinction coefficient

–: no UV absorption, P: Positive, N: Negative

Table 10. Results of Step 2: Skin phototoxicity evaluation based on LLNA

Chemical	LLNA		Skin phototoxicity			P/N
	P/N	EC3 (%)	Concentration (%)	Increase rate of ear thickness (%)		
				Mean (Left)	Mean (Right)	
Ethanol	N	Not calculated	<b>100</b>	2.7	3.5	N
Propyleneglycol	N	Not calculated	<b>100</b>	0.9	2.8	N
1,3-Butyleneglycol	N	Not calculated	<b>100</b>	2.0	4.4	N
2-Propanol	N	Not calculated	<b>100</b>	0.2	0.1	N
2-Ethylhexyl Methacrylate	P	6.5	<b>6.5</b>	3.1	3.6	N
Ketoprofen	N	Not calculated	0.1	7.7	6.0	N
			0.25	1.1	10.4	
			0.5	3.2	13.8	
			<b>1</b>	10.9	11.3	
Piroxicam	P	0.7	0.1	0.4	2.1	N
			<b>0.25</b>	1.0	0.3	
			0.5	-	-	
			0.7	-	-	
Doxycycline Hydrochloride	N	Not calculated	2.5	11.4	9.3	P
			<b>5</b>	19.3	17.3	
			10	25.0	25.1	

N: Negative, P: Positive,-: Data were excluded because of systemic toxicity or excessive irritation

\*: Concentration indicated in bold typed were selected concentration for Step 3

Table 10 (Continued). Results of Step 2: Skin phototoxicity evaluation based on LLNA

Chemical	LLNA		Skin phototoxicity			P/N
	P/N	EC3 (%)	Concentration (%)	Increase rate of ear thickness (%)		
				Mean (Left)	Mean (Right)	
Minocycline Hydrochloride	N	Not calculated	2.5	8.0	7.3	N
			<b>5</b>	6.4	8.5	
Promethazine Hydrochloride	N	Not calculated	<b>25</b>	10.4	12.1	P
			40	25.0	25.3	
			0.01	20.7	16.4	
8-Methoxypsoralen	N	Not calculated	<b>0.025</b>	24.3	22.4	P
			0.05	41.8	39.6	
			0.1	-	-	
			1.0	-	-	
			10	-	-	
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	P	0.006	<b>0.006</b>	1.8	3.0	N
			<b>0.1</b>	12.3	9.2	
Chlorpromazine Hydrochloride	P	2.4	0.25	27.4	23.3	P
			0.5	33.2	30.7	
			1.0	55.4	60.6	
			2.4	-	-	

N: Negative, P: Positive,-: Data were excluded because of excessive irritation

\*: Concentration indicated in bold typed was selected concentration for Step 3

Table 11. Results of Step 3: Photoallergy evaluation

Chemical	Concentration (%)	UV +/-	pSI		Photoallergy P/N
			Mean	SE	
Ethanol	100	-	0.8	0.1	N
		+	0.6	0.0	
Propyleneglycol	100	-	1.0	0.2	N
		+	0.7	0.1	
1,3-Butyleneglycol	100	-	1.0	0.1	N
		+	0.7	0.1	
2-Propanol	100	-	0.8	0.1	N
		+	0.7	0.1	
2-Ethylhexyl Methacrylate	6.5	-	3.2	0.2	N
		+	3.7	0.3	
Ketoprofen	1	-	2.4	0.2	P
		+	4.1 **	0.4	
Piroxicam	0.25	-	1.8	0.2	P
		+	3.6 **	0.6	
Doxycycline Hydrochloride	5	-	1.9	0.1	P
		+	3.0 **	0.4	
Minocycline Hydrochloride	5	-	1.8	0.4	N
		+	1.5	0.2	
Promethazine Hydrochloride	25	-	1.3	0.2	P
		+	12.7 **	2.0	
8-Methoxypsoralen	0.025	-	1.4	0.1	P
		+	3.9 **	0.6	
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	0.006	-	1.6	0.3	P
		+	3.5 **	0.3	

\*\* : Significantly different from the concurrent UV(-) control group (Unpaired *t*-test,  $p < 0.01$ )

N: negative, P: positive

Table 11 (Continued). Results of Step 3: Photoallergy evaluation

Chemical	Concentration (%)	UV +/-	pSI		Photoallergy P/N
			Mean	SE	
Chlorpromazine Hydrochloride	0.1	-	1.3	0.2	P
		+	13.3 **	2.3	

\*\* : Significantly different from the concurrent UV(-) control group (Unpaired *t*-test,  $p < 0.01$ )

N: negative, P: positive

Table 12. Summary of results in three-step approach

Chemicals	UV absorption	Skin sensitization	Skin phototoxicity	Photoallergy
Ethanol	N	N	N	N
Propyleneglycol	N	N	N	N
1,3-Butyleneglycol	N	N	N	N
2-Propanol	N	N	N	N
2-Ethylhexyl Methacrylate	N	P	N	N
Ketoprofen	P	N	N	P
Piroxicam	P	P	N	P
Doxycycline Hydrochloride	P	N	P	P
Minocycline Hydrochloride	P	N	N	N
Promethazine Hydrochloride	P	N	P	P
8-Methoxypsoralen	P	N	P	P
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	P	P	N	P
Chlorpromazine Hydrochloride	P	P	P	P

N:Negative, P:Positive

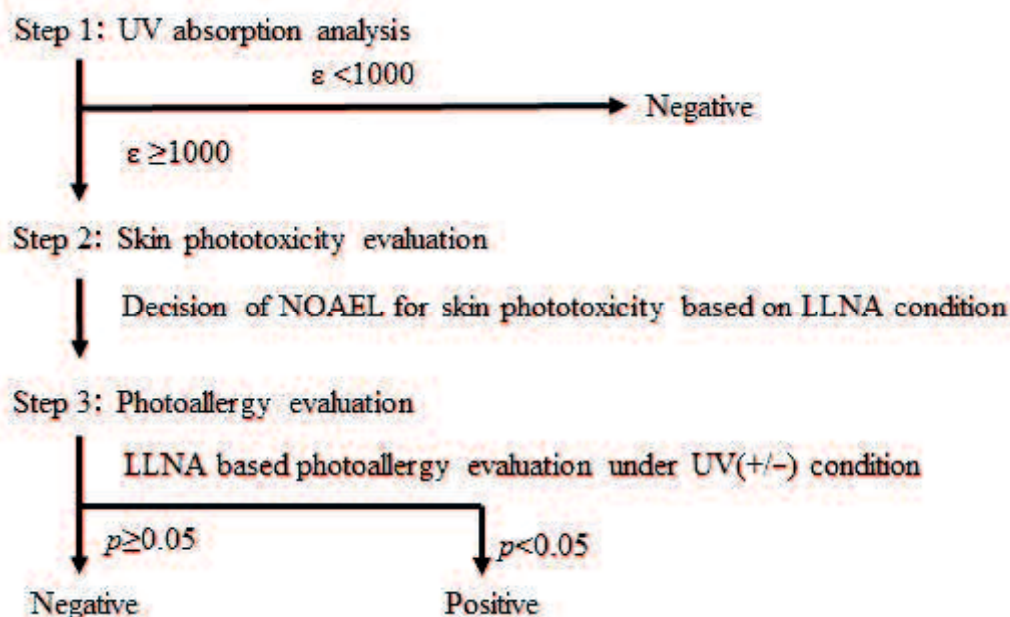


Fig. 11 Flow diagram for photoallergy evaluation

New method consists of three steps; UV spectrum analysis, skin phototoxicity evaluation based on LLNA to determine NOAEL, and photoallergy evaluation based on LLNA. Chemicals with  $\epsilon$  of  $\geq 1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at any wavelength were considered UV absorption-positive and were further subjected to Step 2. Chemicals with  $\epsilon$  of  $< 1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at any wavelength were considered UV absorption-negative. The no observable adverse effect level (NOAEL) for skin sensitization and skin phototoxicity decided based on the results in Steps 2. An unpaired t-test was performed using pSI values for each chemical in the UV+ and concurrent UV- control group. The chemical was considered as photoallergy positive if a significant difference was found between groups ( $p < 0.05$ ) in Step 3.



## 2-3 小括

皮膚感作性の1つの表現系である光アレルギー性は化粧品、医薬及び医薬品などによって引き起こされるヒトの重要な健康問題である。しかし、化学物質の光アレルギー性を予測する既存の光アレルギー性試験は、惹起までを評価するため長期間動物に苦痛を与え、さらにヒトに対して予測可能性が未知であるため、ICH S10 (2013) では推奨されていない。

この問題に対処するために、我々はLLNAを適用して、ヒトの予測可能性が高い新しい光アレルギー性評価法を開発した。

我々の開発した新しい方法は次の3つのステップで構成されている。UVスペクトル解析 (ステップ1)、LLNAに基づく皮膚光毒性評価にてNOAELを決定し (ステップ2)、最後に光照射とLLNAの組合せに基づく光アレルギー評価を行った (ステップ3)。

すべての試験結果をTable 12にまとめた。その結果、7種の物質が陽性と判定され、ヒトにおいて光アレルギー性皮膚炎の報告例がない、もしくはUV吸収の有さない6種の物質が陰性となった。本法は、ketoprofen、piroxicam、doxycycline hydrochloride (DOC)、promethazine hydrochloride及びchlorpromazine hydrochloride など、5種のヒト光アレルギー性物質を明確に光アレルギー性陽性と評価するこ

とができた。

さらに、構造的に類似した化学物質、DOCおよびminocycline hydrochloride (MIC) を試験した。これらは両方のテトラサイクリン抗生物質であるが、DOCはヒトで既知の光アレルギー性物質であり (Tokura 2009, Onoue et al. 2017)、MICはUV吸収を有するにもかかわらずヒトにおいて光毒性または光アレルギー性が報告されておらず非光アレルギー性物質であると考えられている (Tokura 2001)。従来の試験法においてはMICの光アレルギー性に関するデータはなかったが、我々の方法はこれらの化学物質の光アレルギー性を明確に区別できたことから、ヒトの光アレルギー性に対して高い予測精度を有することが示唆された。

以上のことから、我々は感作相で皮膚感作性を評価する LLNA を応用し、惹起が不要で動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法を開発できたと考えられた。

## 第3章 ケラチノサイト活性化を指標とした新規 *in vitro* 皮膚感作性試験法の

### 開発

#### 3-1 小序

皮膚感作に起因するアレルギー性接触皮膚炎は、一般的な職業および環境衛生上重要な問題である (Kimber *et al*, 2002, 2011)。

従来、化学物質の皮膚感作性を評価するために経済協力開発機構 (OECD)

(OECD, 1992) の試験ガイドライン (OECD TG406) に記載されているモルモットを用いた Guinea pig maximization test 及び Buehler test、OECD TG429 (OECD, 2010) として知られる Local Lymph Node Assay (LLNA)、同じく OECD TG442B (OECD, 2018) として知られる LLNA:BrdU-ELISA など、動物を用いた皮膚感作性試験法が使用されてきた。

近年、EU 圏内においては動物愛護などの倫理的理由により、動物実験した成分を含む化粧品の販売が規制禁止されたため (EU, 2013)、化学物質の安全性評価のための動物試験の使用を改善し、削減するための集中的な取り組みが行われてきた。

次の 4 つの重要なイベント (Key event, KE) で構築された皮膚感作のための有

害性転帰経路 (Adverse Outcome Pathway、AOP) が近年発表された (OECD, 2012)。

KE-1: 表皮タンパク質との共有結合

KE-2: ケラチノサイト活性化

KE-3: 樹状細胞活性化

KE-4: T 細胞増殖

現在、化学物質の皮膚感作性を評価するために開発され、OECD TG となっている動物を用いない試験法は、4 つの KE のうちの 1 つのみに焦点をあて評価する試験法である。いずれの試験法も単独での試験法では予測精度に問題があるため、異なる原理の代替法を組み合わせる Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) が OECD でガイダンス化されつつある (OECD, 2019)。

OECD TG 化された KE-2 を評価するための既存方法である KeratinoSens™及び LuSens は、OECD TG442D (OECD, 2018) として OECD によって承認されており、広く使用されている。

しかしながら、これらの試験法は偽陰性及び偽陽性と判定される物質があり、測定精度上の問題を有する。さらに本試験で用いる用量を決定するために細胞毒性を評価するため別に予備試験を必要とし、本試験においてもケラチノサイトの活性化とは別に細胞毒性試験をする必要があり煩雑である。そこで、ヒトへ

の感作性リスク低減のためにより高精度かつ簡便な試験法の開発が必要となっている。

そこで我々は Dual luciferase を用い、ケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時評価可能な高精度かつ簡便な新規 *in vitro* 皮膚感作性試験法の開発を試みた。

すなわち、第 1 の Firefly luciferase (*Photinus pyralis* 由来) を用いて抗酸化反応因子 (ARE)-Nrf2 による転写活性を評価し、第 2 の Renilla luciferase (*Renilla reniformis* 由来) を用いて細胞毒性を同時に評価した。細胞毒性の同時評価のさらなる応用として、ARE-Nrf2 を介した転写活性を生細胞数にて標準化した値を用いて化学物質の皮膚感作性を評価した。

我々が開発した改良 ARE-Nrf2 ベースの皮膚感作スクリーニングアッセイである  $\alpha$ -Sens が LLNA および Human data に対して高い予測精度を示したので報告する。

## 3-2 ケラチノサイト活性化検出のためのレポーター遺伝子構造及び宿主細胞

### の検討

#### はじめに

我々はラット  $\alpha_{2u}$ -globulin (AUG) プロモーターが高い転写活性を有することを発見し、これまでに高感度なレポーター遺伝子アッセイのプロモーターとして使用している。そこで、3-2 では、ARE-Nrf2 パスウェイの活性化を指標としたレポーター遺伝子アッセイの試験系構築のため、プロモーターの塩基長及び宿主細胞の最適な組合せの検討を行った。

#### 材料及び方法

##### 細胞

実験に用いた細胞を Table 13 示す。

不死化正常ヒトケラチノサイトの培養には、初代培養のケラチノサイト培養用の血清不含の MCDB153 培地を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した。

一方、汎用的に用いられる細胞の培養には、10%FBS-DMEM/F-12 を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した。

## プラスミド

皮膚感作性評価用のプラスミドとして、pGL3 (Promega KK., Wisconsin, USA) をベースに antioxidant response element (ARE: 5'-TGGTCGCAAGGTGTGCAAGCTGCTGAGTCACCCTGACTGCATCAACCCCAGGAGCT-3) 及び高転写活性を有することが報告されている AUG プロモーター (Takeyoshi *et al.* 2003) を TATA Box からの塩基長が異なる 3 種類をそれぞれ挿入したプラスミド (pARE-AUG) を作製した (Table 14)。

細胞毒性の評価には *Renilla luciferase* 発現プラスミド (pRL-TK) (Promega KK., Wisconsin, USA) を用いた。

## 化学物質

実験には OECD TG442D の技術習得用の 10 物質及び陽性対照物質である Cinnamic aldehyde を用いた (Table 15)。

全ての化学物質の溶媒には Dimethyl sulfoxide (DMSO, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用いた。

## 宿主細胞の検討

OECD TG442D の陽性対照物質である Cinnamic aldehyde を用い、宿主細胞を

検討した。

各細胞を 6cm 細胞培養用ディッシュに播種した後、それぞれのプラスミド 6 $\mu$ g を Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific K.K.)を用いて各細胞にトランスフェクションし、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 72 時間培養した。

Cinnamic aldehyde は 20mM Cinnamic aldehyde 溶液を調製し、その後公比 2 で DMSO を用いて段階希釈した後、細胞培養用の培地で 50 倍希釈した。

トランスフェクション後、96 ウェルプレートに播種し (1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ウェル)、5 時間培養後、Cinnamic aldehyde 溶液をばく露し 24 時間培養した。媒体対照である DMSO も Cinnamic aldehyde と同様の方法に従った。

24 時間培養した後、各ウェルの培地を除去し、50  $\mu$ L の Dual-Glo<sup>®</sup> Reagent (Promega KK., Wisconsin, USA)を加え、10 分した後マイクロプレートリーダー (ARVO X2, Perkin Elmer, Inc., Waltham, USA) で化学発光を測定し、*Firefly luciferase* の活性を測定した。その後、50  $\mu$ L の Dual-Glo<sup>®</sup> Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent (Promega KK., Wisconsin, USA)を加え、10 分後にマイクロプレートリーダーで化学発光を測定し、*Renilla luciferase* の活性を測定した。

Fold induction は *Firefly luciferase* の活性から得られる RLU を用い、次の計算式から算出した。



Fold induction =各ウェルの luciferase の RLU /媒体対照の luciferase の平均 RLU

細胞生存率に関しては、*Renilla luciferase* (rLuc) の活性から得られる RLU を用い、次の計算式から算出した。

細胞生存率 (%) = (各ウェルの rLuc の RLU /媒体対照の rLuc の平均 RLU) × 100

全ての化学物質について 12 濃度で 3 回試験し、試験ごとに得られた Fold induction の平均値及び標準偏差 (SD) を算出した。

評価基準は暫定的に OECD TG442D と同様とし、Fold induction が 1.5 を上回ったとき陽性とし、もっとも高い Fold induction の値を I<sub>max</sub> とした。

Fold induction が 1.5 となる推定濃度を EC1.5 とし、下記の計算式から算出した。

$$EC1.5 = c + \{(1.5 - d) / (b - d)\} \times (a - c)$$

ここで (a、b) および (c、d) は、Fold induction が 1.5 を上回る最小及び Fold induction が 1.5 を下回る最大に位置する (用量、Fold induction) をそれぞれ表す。

## AUG プロモーターの塩基長の検討

Cinnamic aldehyde に対して良好な反応を示した PHK 16-0b 及び CHO を用い、各細胞に 3 種類の pGL3-ARE-AUG をそれぞれトランスフェクションした。それ以外の条件に関しては宿主細胞の検討と同様の条件とした。

## OECD TG442D 技術確認用物質を用いた一過性発現系における性能比較

Cinnamic aldehyde に対して良好な反応を示した PHK 16-0b 及び CHO を用い、PHK 16-0b を宿主とした時に I<sub>max</sub> が最も高く、EC<sub>1.5</sub> が最も低くなった pGL3-ARE-AUG200 をレポーター遺伝子のコンストラクトとして用いた。OECD TG442D 技術確認用物質は Table 15 に示した 10 物質を用いた。

それ以外の試験条件は全てこれまでの条件検討と同様に試験し、既存の試験法との比較は EC<sub>1.5</sub> を用いて行った。

## 結果

### 宿主細胞の検討

宿主細胞の検討結果を Table 16 に示す。

PHK16-0b を用いた場合に EC1.5 は 1.5 $\mu$ M と算出され、最も低くかった。

Imax については 12.8 と算出され、最大を示した。

次いで CHO を用いた場合に高い活性が認められたため、この 2 種の細胞を以後の検討に用いた。

### AUG プロモーターの塩基長の検討

AUG プロモーターの塩基長の検討結果を Table 17 に示す。

CHO ではプロモーターによる結果の違いは認められなかったものの、PHK 16-0b では AUG200 をプロモーターに用いると EC1.5 が 1.5 $\mu$ M と算出され最も低く、Imax は 12.8 と算出され、最大を示した。

### OECD TG442D 技術確認用物質を用いた一過性発現系における性能比較

OECD TG442D 技術確認用物質を用いた一過性発現系における性能比較結果を Table 18 に示す。CHO 及び PHK 16-0b のどちらを宿主細胞株にした場合でも全技術確認用物質の感作性判定は TG442D と合致した。陽性となった 6 物質に

関して CHO 細胞を用いた場合 EC1.5 は全物質 Reference range 内となり、PHK 16-0b に関しては 6 物質中 Ethylene glycol dimethacrylate、Methyldibromogultaronitrile、4- (Methylamino) phenol sulfate 及び 2,4-Dinitro chlorobenzene の 4 物質に関して EC1.5 は Reference range 内となり、Cinnamiyl alcohol 及び 2-Mercaptbenzothiazole の 2 物質に関しては Reference range を下回った。

## まとめ

宿主細胞に PHK 16-0b を用い、ARE 及び AUG プロモーター（塩基長 200）を有するレポータープラスミドを用いることで OECD TG442D と同様の判定結果が得られた。本試験系では細胞毒性も同時に評価可能であり、また全技術確認用物質の EC1.5 は文献値よりも低かったことから、簡便かつ高感度に皮膚感作性を評価できる可能性が示唆された。

Table 13 List of host cell lines

細胞	供給源	登録番号	由来
SVIA6	JCRB Cell Bank	JCRB1092	ヒト子宮頸部由来不死化ケラチノサイト
SVIIA3	JCRB Cell Bank	JCRB1091	ヒト子宮頸部由来不死化ケラチノサイト
NCE16	JCRB Cell Bank	JCRB0140	ヒト子宮頸部由来不死化ケラチノサイト
PSVK1	JCRB Cell Bank	JCRB1093	ヒト男性器包皮由来不死化ケラチノサイト
PHK16-0b	JCRB Cell Bank	JCRB0141	ヒト男性器包皮由来不死化ケラチノサイト
HeLa229	JCRB Cell Bank	JCRB9086	ヒト子宮頸部類上皮がん由来細胞株
CHO	RIKEN Cell Bank	RCB0285	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株

Table 14 List of plasmide

---

プラスミド	プロモーター塩基長
ARE-AUG100	約 100bp
ARE-AUG150	約 150bp
ARE-AUG200	約 200bp

---

Table 15 List of use chemicals in transient reporter gene assay

物質名	CAS	TG429 結果	TG442D 結果
Isopropanol	67-63-0	Non-sensitiser	Negative
Salicylic acid	69-72-7	Non-sensitiser	Negative
Lactic acid	50-21-5	Non-sensitiser	Negative
Glycerol	56-81-5	Non-sensitiser	Negative
Cinnamyl alcohol	104-54-1	Sensitiser	Positive
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	Sensitiser	Positive
2-Mercaptbenzothiazol	149-30-4	Sensitiser	Positive
Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7	Sensitiser	Positive
4-(Methylamino)phenol sulfates	55-55-0	Sensitiser	Positive
2,4-Dinitro-chlorobenzene	97-00-7	Sensitiser	Positive



Table 16 Summary of host cell line decision

細胞	EC1.5( $\mu\text{M}$ )	Imax	Imax FL
SVIA6	NC	1.5	15
SVIIA3	7.8	2.9	44
NCE16	13.4	3.9	678
PSVK1	3.5	5.3	77
PHK16-0b	1.5	12.8	617
HeLa229	NC	NC	NC
CHO	4.5	5.6	42806

Table 17 Summary of plasmid decision

プラスミド	Run	CHO						PHK 16-0b					
		EC1.5(μM)			Imax			EC1.5(μM)			Imax		
		個別値	平均	SD	個別値	平均	SD	個別値	平均	SD	個別値	平均	SD
ARE-AUG100	1	2.0	4.3	3.1	5.0	5.7	0.6	2.7	1.8	0.8	4.5	5.2	0.6
	2	3.1			6.1			1.3			5.5		
	3	7.8			5.9			1.4			5.6		
ARE-AUG150	1	2.6	4.4	3.0	4.6	5.0	0.5	3.3	2.9	0.8	5.2	6.1	1.5
	2	7.8			4.9			2.0			7.8		
	3	2.7			5.6			3.4			5.2		
ARE-AUG200	1	2.0	4.5	3.0	5.2	5.6	0.4	1.6	1.5	0.3	8.9	12.8	3.5
	2	3.6			5.6			1.2			15.7		
	3	7.8			6.0			1.8			13.8		

Table 18 Summary of transient reporter gene assay using CHO cell line and PHK 16-0b

cell line

Proficiency substances	TG442D			CHO			PHK 16-0b		
	判定	EC1.5		判定	EC1.5		判定	EC1.5	
		Reference range	文献値		Mean	SD		Mean	SD
Isopropanol	N	>1000	NC	N	NC	NC	N	NC	NC
Salicylic acid	N	>1000	NC	N	NC	NC	N	NC	NC
Lactic acid	N	>1000	NC	N	NC	NC	N	NC	NC
Glycerol	N	>1000	NC	N	NC	NC	N	NC	NC
Cinnamyl alcohol	P	25-175	123.6	P	28.6	13.7	P	20.9	6.2
Ethylene glycol dimethacrylate	P	5-125	57.4	P	15.3	6.7	P	15.9	10.7
2-Mercaptbenzothiazol	P	25-250	48.1	P	41.3	18.7	P	21.1	1.1
Methyldibromo glutaronitrile	P	<20	7.8	P	1.8	1	P	3.7	1.5
4-(Methylamino)phenol sulfata	P	<12.5	9.4	P	1.5	0.3	P	1.4	0.4
2,4-Dinitro-chlorobenzene	P	<12.5	2.5	P	1.2	0.5	P	0.4	0.1

### 3-3 安定発現株の構築及び安定発現株を用いた試験法の開発

#### はじめに

3-2 で得られたプロモーターの塩基配列の長さ及び最適な宿主細胞の組合せを応用して安定発現株を作製し、作製した安定発現株を使用した試験系を  $\alpha$ -Sens と名付け、その性能評価を行った。

#### 材料と方法

##### 化学物質

使用した化学物質を Table 19 に示す。

本研究では KeratinoSens<sup>TM</sup> (DB-ALM, 2013) の施設間バリデーションで用いられた陽性 19 物質、陰性 9 物質の合計 28 物質を用いた。全ての化学物質の溶媒には Dimethyl sulfoxide (DMSO, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用いた。

##### $\alpha$ -Sens assay のための細胞作製

3-2 の結果から不死化ヒトケラチノサイト株である PHK 16-0b (JCRB cell bank, Osaka, Japan) を宿主細胞として用いた。

細胞は HKGS (Thermo Fisher Scientific K. K., Massachusetts, USA) を含む Epi-Life

培地 (Thermo Fisher Scientific K. K., Massachusetts, USA) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で維持した。

ARE-Nrf2 パスウェイの活性化を測定するレポーター遺伝子導入用のレンチウイルスベクターを作製するために、3-2 で決定した塩基長のラット  $\alpha_2$ U-globulin (AUG) プロモーター (Takeyoshi et al., 2003)、antioxidant response element (ARE: 5'-TGGTCGCAAGGTGTGCAAGCTGCTGAGTCACCCTGACTGCATCAACCAGGAGCT-3) 及び *Firefly* luciferase 遺伝子を pLV5IN (Takara Bio Inc., Shiga Japan) に挿入し、pLV5IN-ARE-AUG-Luc を作製した。また細胞毒性を測定するレポーター遺伝子導入用のレンチウイルスベクターを作製するために、Thymidine kinase (TK) プロモーター及び *Renilla* luciferase (rLuc) を pLV5IN に挿入し、pLV5IN-TK-rLuc を作製した。

各レポーター遺伝子導入用のレンチウイルスベクターは pLentiviral High Titer Packaging Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて作製した。pLV5IN-ARE-AUG-Luc もしくは pLV5IN-TK-rLuc と packaging mix を TransIT<sup>®</sup>-293 Transfection 試薬 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて Lenti-X<sup>™</sup> 293T 細胞 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) へ同時にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 48 時間培養した。その後培養液上清を取得し、DISMIC-25AS filter (0.44  $\mu$ m, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan) を用いて細胞

デブリを除去し、ろ過液を細胞への感染用のウイルス液として用いた。

ARE-AUG-Luc もしくは TK-rLuc を挿入するためのレンチウイルスベクターを PHK 16-0b に感染させ、50 µg/mL Hygromycin B Gold (InvivoGen, CA, USA) 及び 2.5 µg/mL of puromycin (Thermo Fisher Scientific K. K., Massachusetts, USA) を含む培地で7日間培養し、増殖した細胞を試験に用いた。

### **Mitochondrial reductase 活性を指標とした細胞毒性試験及び *Renilla luciferase* の転写活性を指標とした細胞毒性試験の比較**

OECD TG442D における陽性対照物質である Cinnamic aldehyde (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を、KeratinoSens™ 及び LuSens で用いられている Mitochondrial reductase 活性を指標とした細胞毒性試験の結果及び *Renilla luciferase* の転写活性を指標とした細胞毒性試験の結果と比較した。

本研究では、Mitochondrial reductase 活性を指標とした細胞毒性試験は、従来からよく用いられてきた Methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay と同様の結果を得ることができる Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Osaka, Japan) を用いる Water Soluble Tetrazolium salts-8 (WST-8) assay を実施した。

Cinnamic aldehyde は 20mM DMSO 溶液を公比 2 で段階希釈した後、細胞培養用の培地で 50 倍希釈した。細胞は 96 ウェルのプレートに  $2 \times 10^6$  cells/mL の細

胞懸濁液 100 $\mu$ L/ウェル播種し (20000 cells/well)、24 時間前培養した。前培養後、Cinnamic aldehyde の DMSO 希釈液を各ウェル 100  $\mu$ L ずつ加え、24 時間培養した。媒体対照である DMSO も Cinnamic aldehyde と同様の流れで細胞にばく露した。培養後、各ウェルの培養液を除去し、細胞培養用の培地で 5 倍に希釈した CCK-8 を各ウェルに 100 $\mu$ L ずつ加えた。37 $^{\circ}$ C 、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 1 時間培養した後、マイクロプレートリーダー (ARVO X2, Perkin Elmer, Inc., Waltham, USA) で 450nm の波長の吸光度を測定した。

細胞生存率 (%) = 各ウェルの吸光度/媒体対照の平均吸光度 $\times$  100

*Renilla luciferase* (rLuc) の活性を指標にした細胞生存率に関しては、rLuc の活性から得られる RLU を用い、次の計算式から算出した。

細胞生存率 (%) = (各ウェルの rLuc の RLU /媒体対照の rLuc の平均 RLU)  $\times$  100

その後、Mitochondrial reductase 活性を指標とした細胞毒性試験の結果及び  $\alpha$ -Sens における *Renilla luciferase* の転写活性を指標とした細胞毒性試験の結果を比較した。算出可能な場合、IC50 値は統計解析ソフトウェア (Graphpad PRISM

version 6.02, Graphpad software Inc., CA, USA) を用いて算出した。

### **$\alpha$ -Sens assay**

全ての化学物質は 200mM DMSO 溶液を調製後公比 2 で 12 濃度段階希釈した後、細胞培養用の培地で 50 倍希釈した。

細胞は 96 ウェルのプレート (#136102, Thermo Fisher Scientific K. K., Massachusetts, USA) に  $2 \times 10^6$  cells/mL の細胞懸濁液 100 $\mu$ L/ウェル播種し (20000 cells/well)、24 時間前培養した。前培養後、化学物質の DMSO 希釈液を各ウェル 100  $\mu$ L ずつ加え、24 時間培養した (終濃度: 2000  $\mu$ M to 0.977  $\mu$ M with 1% DMSO)。媒体対照である DMSO も化学物質と同様の流れで希釈調製し、細胞にばく露した。

各ウェルの培地を除去し、50  $\mu$ L の Dual-Glo<sup>®</sup> Reagent (Promega KK., Wisconsin, USA) を加え、10 分した後マイクロプレートリーダー (ARVO X2, Perkin Elmer, Inc., Waltham, USA) で化学発光を測定し、*Firefly luciferase* の活性を測定した。その後、50  $\mu$ L の Dual-Glo<sup>®</sup> Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent (Promega KK., Wisconsin, USA) を加え、10 分後にマイクロプレートリーダーで化学発光を測定し、*Renilla luciferase* の活性を測定した。

ARE-Nrf2 パスウェイの活性化を示す *Firefly luciferase* の活性によって得られ



る Relative Light Unit (RLU) を、同一ウェルの生細胞数を示す *Renilla luciferase* の活性によって得られる RLU で除すことで、生細胞数で標準化した RLU すなわち normalized RLU (nRLU) を算出した。

その後、次の式から normalized ARE Activity (nAA) を算出した。

$$\text{nAA} = \text{各ウェルの nRLU} / \text{媒体対照の平均 nRLU}$$

Fold induction は *Firefly luciferase* の活性から得られる RLU を用い、次の計算式から算出した。

$$\text{Fold induction} = \text{各ウェルの Firefly luciferase の RLU} / \text{媒体対照の Firefly luciferase の平均 RLU}$$

細胞生存率に関しては、*Renilla luciferase* (rLuc) の活性から得られる RLU を用い、次の計算式から算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (\text{各ウェルの rLuc の RLU} / \text{媒体対照の rLuc の平均 RLU}) \times 100$$

全ての化学物質について 12 濃度で 3 回試験し、各試験で得られた最大 nAA を

用いて平均値及び標準偏差 (SD) を算出した。

### 感作性判定のための最適カットオフの決定

最適カットオフは最大 nAA が最も高い陰性物質の最大 nAA+2SD とし、ヒトの感作性データと一致率 (%) が最も高くなる値を選択した。

### $\alpha$ -Sens, KeratinoSens™ 及び LuSens の予測精度比較

Cooper statistics (Cooper *et al.*, 1979) により、 $\alpha$ -Sens の sensitivity (LLNA もしくはヒトのデータの陽性物質に対する  $\alpha$ -Sens の陽性物質の割合) 、 specificity (LLNA もしくはヒトのデータの陰性物質に対する  $\alpha$ -Sens の陰性物質の割合) 及び accuracy (全物質の一致率) を算出した。KeratinoSens™ 及び LuSens も同様に算出した。

## 結果

### Mitochondrial reductase 活性を指標とした細胞毒性試験及び Renilla luciferase の 転写活性を指標とした細胞毒性試験の比較

OECD TG442D の陽性対照物質である Cinnamic aldehyde に対して、WST-8 を用いた細胞毒性試験の結果及び rLuc の転写活性を指標とした細胞毒性試験の結果の比較を Fig. 12 に示した。

rLuc の転写活性を指標とした細胞毒性試験の結果、IC50 は 61.9 $\mu$ M と算出され、200 $\mu$ M においては、細胞生存率は 0.9%であった。

一方、WST-8 を用いた細胞毒性試験の結果では 200 $\mu$ M において 50%を上回る細胞生存率であったため IC50 は算出されなかった。

### $\alpha$ -Sens assay

$\alpha$ -Sens の結果、算出された nAA を Table 20 及び Fig.13 に示した。皮膚感作性陰性物質の最大 nAA は 0.85-1.32 の範囲となり、皮膚感作性陽性物質の最大 nAA は 1.76-26.42 の範囲となった。

## 皮膚感作性判定のための最適カットオフ

各暫定基準における皮膚感作性判定の一致率を Table 21 に示した。

皮膚感作性陰性物質中最大 nAA(1.32)+2SD(=1.57)、を上回る 1.6 をカットオフとした時、皮膚感作性判定の一致率はヒトのデータに対しては 100%、LLNA に対しては 96.4%となり最も一致率が高くなったため、1.6 を本研究における最適なカットオフとして決定した。

## $\alpha$ -Sens, KeratinoSens<sup>TM</sup> 及び LuSens の予測精度比較

$\alpha$ -Sens, KeratinoSens<sup>TM</sup> 及び LuSens の結果を Table 22 にまとめ、各試験法における LLNA 及びヒトのデータに対する accuracy、sensitivity 及び specificity を算出し、Table 23 にまとめた。

LLNA に対する  $\alpha$ -Sens の accuracy、sensitivity 及び specificity はそれぞれ 96.4%、95.0%及び 100.0%と算出され、ヒトのデータに対しては全て 100%となった。

KeratinoSens<sup>TM</sup> では、LLNA に対する accuracy、sensitivity 及び specificity はそれぞれ 89.3%、85.0%及び 100.0%と算出され、ヒトのデータに対してはそれぞれ 92.9%、89.5%及び 100.0%と算出された。一方、LuSens、LLNA に対する accuracy、sensitivity 及び specificity はそれぞれ 89.3%、90.0%及び 87.5%と算出され、ヒトのデータに対してはそれぞれ 92.9%、94.7%及び 88.9%と算出された。

## まとめ

3-2 で得られた結果を基に、ケラチノサイトの活性化及び細胞毒性を同時評価可能な安定発現株を用いた試験系  $\alpha$ -Sens を開発した。 $\alpha$ -Sens は皮膚感作性評価のため、ARE-Nrf2 パスウェイの活性化を生細胞数で標準化する新たな評価パラメーター-normalized ARE Activity (nAA) を導入した。本法は LLNA に対する accuracy、sensitivity 及び specificity はそれぞれ 96.4%、95.0%及び 100.0%と算出され、ヒトのデータに対しては全て 100%となり、既存の KE-2 試験法である KeratinoSens<sup>TM</sup> 及び LuSens と比較し高精度であった。また本法は細胞毒性を同時に測定するため予備試験が不要であり、既存 KE-2 試験法と比較し簡便であった。

**Table 19 Chemicals used in this study**

Chemical	CASRN	Source	LLNA Result (EC3)	Human data <sup>5</sup>
Oxazolone	15646-46-5	SIGMA	P(0.0028) <sup>3</sup>	P
5-Chloro-2-methylisothiazolinone	26172-55-4	FLUKA	P(0.01) <sup>3</sup>	P
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	TCI <sup>1</sup>	P(0.049) <sup>3</sup>	P
4-Nitrobenzylbromide	100-11-8	TCI <sup>1</sup>	P(0.1) <sup>3</sup>	P
4-Phenylenediamine	106-50-3	TCI <sup>1</sup>	P(0.11) <sup>3</sup>	P
Glyoxal	107-22-2	TCI <sup>1</sup>	P(0.7) <sup>3</sup>	P
4-Methylaminophenolsulphate	55-55-0	TCI <sup>1</sup>	P(0.8) <sup>3</sup>	P
Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7	FLUKA	P(0.9 /1.9) <sup>3</sup>	P
Cinnamic aldehyde	104-55-2	Wako <sup>2</sup>	P(1.3) <sup>3</sup>	P
Isoeugenol	97-54-1	TCI <sup>1</sup>	P(1.5) <sup>3</sup>	P
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	FLUKA	P(2.5) <sup>3</sup>	P
Tetramethylthiuramdisulfide	137-26-8	FLUKA	P(3.1) <sup>3</sup>	P
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	FLUKA	P(8.1) <sup>4</sup>	N
Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	Wako <sup>2</sup>	P(9.9) <sup>3</sup>	P
Citral	5392-40-5	TCI <sup>1</sup>	P(9.8) <sup>3</sup>	P
Eugenol	97-53-0	TCI <sup>1</sup>	P(10.1) <sup>3</sup>	P
Phenyl benzoate	93-99-2	TCI <sup>1</sup>	P(13.6) <sup>3</sup>	P
Cinnamyl alcohol	104-54-1	SIGMA	P(21.0) <sup>3</sup>	P
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	SIGMA	P(24.0) <sup>3</sup>	P
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	TCI <sup>1</sup>	P(32.9) <sup>3</sup>	P
Chlorobenzene	108-90-7	TCI <sup>1</sup>	-	N
Diethyl phthalate	84-66-2	TCI <sup>1</sup>	-	N
Glycerol	56-81-5	Wako <sup>2</sup>	-	N
Isopropanol	67-63-0	Wako <sup>2</sup>	-	N
Lactic acid	50-21-5	Wako <sup>2</sup>	-	N
Methyl salicylate	119-36-8	TCI <sup>1</sup>	-	N
Salicylic acid	69-72-7	TCI <sup>1</sup>	-	N
Sulfanilamide	63-74-1	TCI <sup>1</sup>	-	N

P: Positive, N: Negative

<sup>1</sup>: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., <sup>2</sup>: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, <sup>3</sup>:DB-ALM, 2013, <sup>4</sup>: ICCVAM, 2009, <sup>5</sup>: Tzutzu et al., 2014

**Table 20 Summary of the results of  $\alpha$ -Sens**

Chemical	Mean maximum nAA $\pm$ SD	Cell viability (%)
Oxazolone	2.35 $\pm$ 0.35	76.5
5-Chloro-2-methylisothiazolinone	2.45 $\pm$ 0.29	57.7
2,4-Dinitrochlorobenzene	5.7 $\pm$ 1.58	52.6
4-Nitrobenzylbromide	1.75 $\pm$ 0.05	71.2
4-Phenylenediamine	7.77 $\pm$ 1.46	50.5
Glyoxal	2.44 $\pm$ 0.3	57.1
4-Methylaminophenolsulphate	4.92 $\pm$ 0.8	58.4
Methyldibromo glutaronitrile	3.41 $\pm$ 0.72	76.5
Cinnamic aldehyde	18.94 $\pm$ 2.26	70.9
Isoeugenol	4.21 $\pm$ 0.16	65.1
2-Mercaptobenzothiazole	2.91 $\pm$ 0.17	54.2
Tetramethylthiuramdisulfide	2.62 $\pm$ 0.48	80.9
Sodium lauryl sulfate	1.06 $\pm$ 0.13	87.1
Hexyl cinnamic aldehyde	2.77 $\pm$ 0.19	77.3
Citral	5.46 $\pm$ 1.03	77.2
Eugenol	2.7 $\pm$ 0.52	63
Phenyl benzoate	1.89 $\pm$ 0.1	61.7
Cinnamyl alcohol	8.08 $\pm$ 0.19	54.3
Imidazolidinyl urea	2.82 $\pm$ 0.44	80
Ethylene glycol dimethacrylate	26.42 $\pm$ 5.72	56.1
Chlorobenzene	0.85 $\pm$ 0.14	102.6
Diethyl phthalate	1.32 $\pm$ 0.13	67.4
Glycerol	1.15 $\pm$ 0.23	102.1
Isopropanol	1.07 $\pm$ 0.18	104.5
Lactic acid	1.18 $\pm$ 0.2	83.5
Methyl salicylate	1.31 $\pm$ 0.13	105.3
Salicylic acid	1.11 $\pm$ 0.18	98.8
Sulfanilamide	0.99 $\pm$ 0.12	94.7

**Table 21 Determination of the optimal cutoff for  $\alpha$ -Sens**

	Correct outcome (%) obtained by the nAA cutoff value								
	$\geq 1.2$	$\geq 1.3$	$\geq 1.4$	$\geq 1.5$	<b><math>\geq 1.6</math></b>	$\geq 1.7$	$\geq 1.8$	$\geq 1.9$	$\geq 2.0$
vs. LLNA	89.3	89.3	96.4	96.4	<b>96.4</b>	96.4	89.3	82.1	82.1
vs. Human data	92.9	92.9	100.0	100.0	<b>100.0</b>	100.0	92.9	89.3	89.3

Bold type: Optimal cutoff criterion



**Table 22 Summary of the outcomes in the  $\alpha$ -Sens, KeratinoSens<sup>TM</sup> and LuSens**

Chemical	LLNA <sup>1</sup>	KeratinoSens <sup>TM</sup>	LuSens <sup>2</sup>	Human data <sup>2</sup>	$\alpha$ -Sens
Oxazolone	P	P	P	P	P
5-Chloro-2-methylisothiazolinone	P	P	P	P	P
2,4-Dinitrochlorobenzene	P	P	P	P	P
4-Nitrobenzylbromide	P	P	P	P	P
4-Phenylenediamine	P	P	P	P	P
Glyoxal	P	P	P	P	P
4-Methylaminophenolsulphate	P	P	P	P	P
Methyldibromo glutaronitrile	P	P	P	P	P
Cinnamic aldehyde	P	P	P	P	P
Isoeugenol	P	P	P	P	P
2-Mercaptobenzothiazole	P	P	P	P	P
Tetramethylthiuramdisulfide	P	P	P	P	P
Sodium lauryl sulfate	P	N	N	N	N
Hexyl cinnamic aldehyde	P	P	P	P	P
Citral	P	P	P	P	P
Eugenol	P	N	P	P	P
Phenyl benzoate	P	N	N	P	P
Cinnamyl alcohol	P	P	P	P	P
Imidazolidinyl urea	P	P	P	P	P
Ethylene glycol dimethacrylate	P	P	P	P	P
Chlorobenzene	N	N	N	N	N
Diethyl phthalate	N	N	N	N	N
Glycerol	N	N	N	N	N
Isopropanol	N	N	N	N	N
Lactic acid	N	N	N	N	N
Methyl salicylate	N	N	P	N	N
Salicylic acid	N	N	N	N	N
Sulfanilamide	N	N	N	N	N

P: Positive, N: Negative

<sup>1</sup>: DB-ALM, 2013, <sup>2</sup>: Tzutzuy *et al.*, 2014

**Table 23 Comparison of predictive performance of  $\alpha$ -Sens, KeratinoSens<sup>TM</sup>, and LuSens**

vs. LLNA		$\alpha$ -Sens		KeratinoSens <sup>TM</sup>		LuSens	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
LLNA	Positive	19	1	17	3	18	2
	Negative	0	8	0	8	1	7
Sensitivity (%)		95.0		85.0		90.0	
Specificity (%)		100.0		100.0		87.5	
Accuracy (%)		96.4		89.3		89.3	

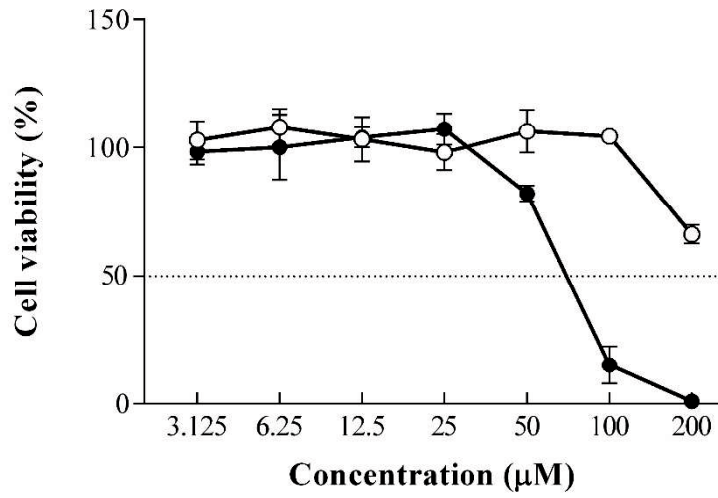
vs. Human data		$\alpha$ -Sens		KeratinoSens <sup>TM</sup>		LuSens	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Human	Positive	19	0	17	2	18	1
	Negative	0	9	0	9	1	8
Sensitivity (%)		100.0		89.5		94.7	
Specificity (%)		100.0		100.0		88.9	
Accuracy (%)		100.0		92.9		92.9	

Sensitivity (%) =  $TP/(TP+FP) \times 100$ .

Specificity (%) =  $TN/(TN+FN) \times 100$ .

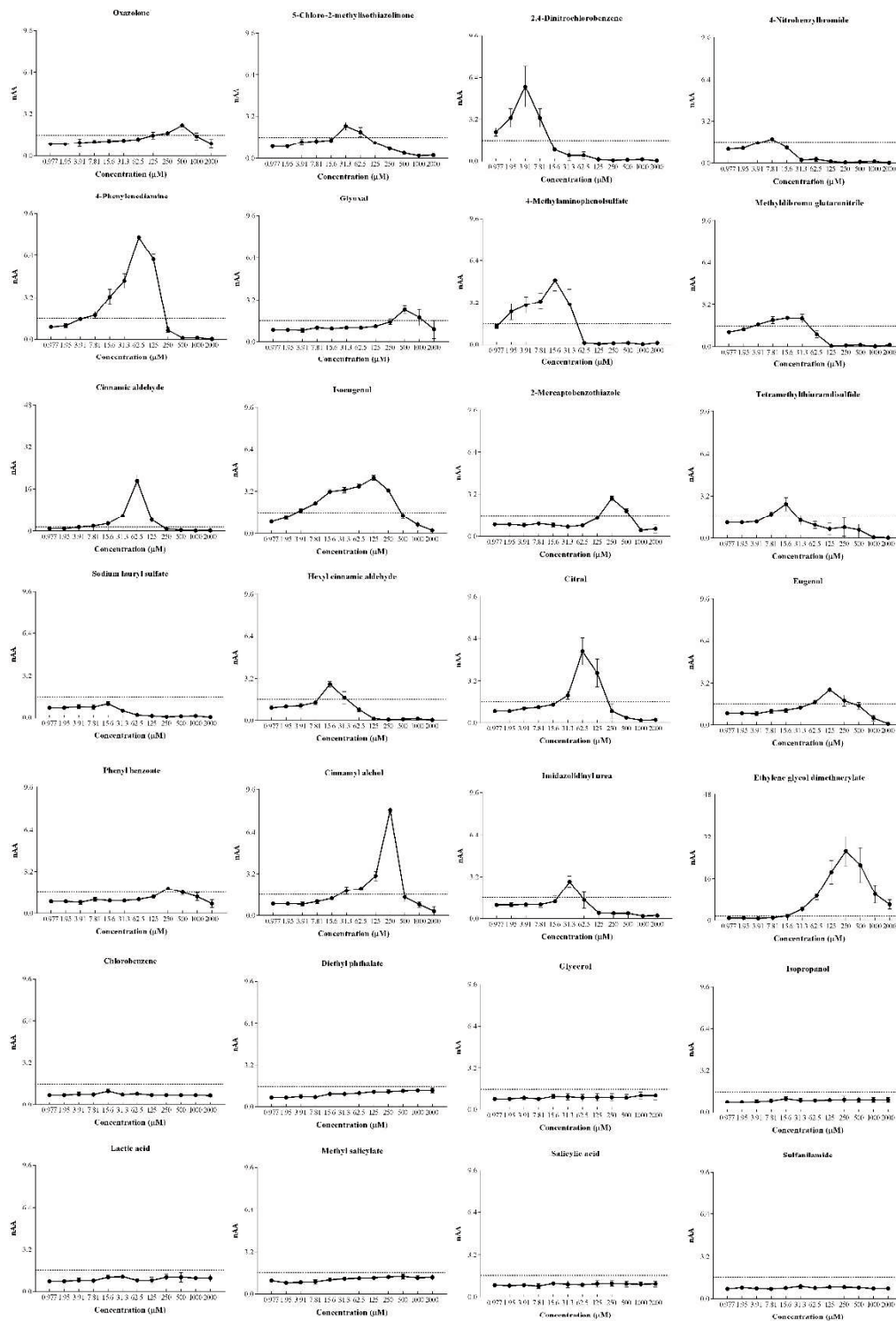
Accuracy (%) =  $(TP+TN) / (TP+FP+TN+FN) \times 100$ .

TP: True positive, FP: False positive, TN: True negative, FN: False negative.



**Fig. 12 Comparison of the outcome of cytotoxicity tests of cinnamic aldehyde using the reporter gene assay and the mitochondrial reductase activity**

Open circle: cell viability based on mitochondrial reductase activity, closed circle: cell viability based on *Renilla* luciferase activity.

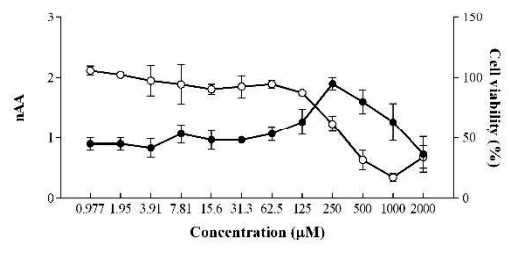
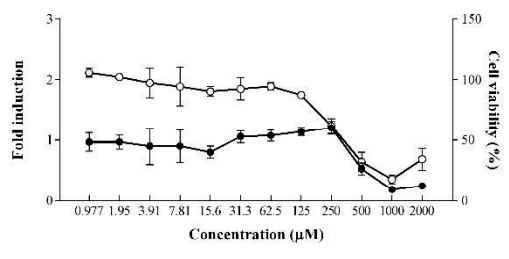


**Fig. 13 Dose-related changes in nAA of chemicals**

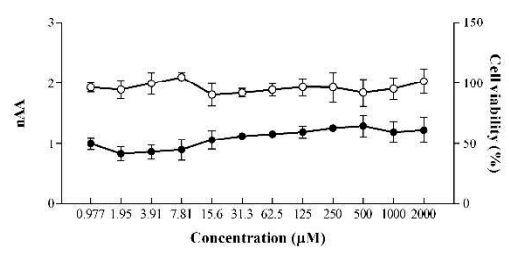
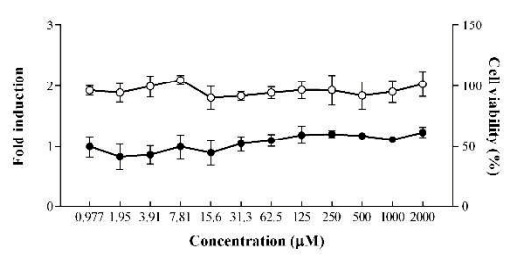
The  $\alpha$ -Sens cell line was treated with different concentrations of each chemical for 24h.

Broken line: Cut off (nAA=1.6)

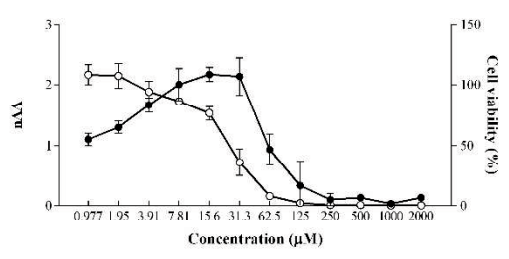
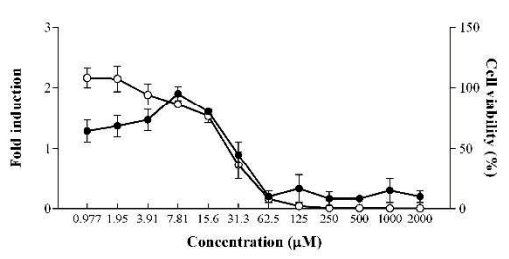
**(a)** Phenyl benzoate



Methyl salicylate



**(b)** Methyl dibromo glutaronitrile



**Fig. 14 Dose-related changes in fold induction, nAA and cell viability in  $\alpha$ -Sens**  
The  $\alpha$ -Sens cell line was treated with different concentrations of phenyl benzoate, methyl salicylate (a), and methyl dibromo glutaronitrile (b) for 24h. Open circle: cell viability, closed circle: fold induction of transcriptional activity (left) or nAA (right).

### 3-4 小括

近年、EU の化粧品規制において、動物愛護の観点から動物実験を実施した物質を含む化粧品は EU 圏内で販売することが禁止された (EU、2013)。そのため、動物を使用せずに化学物質の皮膚感作性を評価する手法の開発が活発になっている。動物を用いない化学物質の皮膚感作性試験法は、OECD から発効された皮膚感作性の AOP には 4 つの KE のうち 1 つのみをカバーしている。

既存の KE-2 を評価する試験法として OECD TG 442D となっている KeratinoSens™ 及び LuSens (OECD, 2018) があるが、これらの試験法は偽陰性及び偽陽性と判定される物質があり、測定精度上の問題を有する。さらに本試験で用いる用量を決定するために細胞毒性を評価するため別に予備試験を必要とし、本試験においてもケラチノサイトの活性化とは別に細胞毒性試験をする必要があり煩雑である。そこで、ヒトへの感作性リスク低減のためにより高精度かつ簡便な試験法の開発が必要となっている。

そこで我々は Dual luciferase を用い、ケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時評価可能な高精度かつ簡便な新規 *in vitro* 皮膚感作性試験法の開発を試みた。

すなわち、*Firefly luciferase* (*Photinus pyralis* 由来) を用いて ARE-Nrf2 による転写活性を評価し、*Renilla luciferase* (*Renilla reniformis* 由来) を用いて細胞毒性を同時に評価した。

OECD TG442D の陽性対照物質である Cinnamic aldehyde を被験物質として mitochondrial reductase 活性を指標とした細胞毒性試験結果及び *Renilla luciferase* (rLuc) の転写活性を指標とした細胞毒性試験結果を比較したところ、rLuc の転写活性を指標とした細胞毒性試験の結果、IC50 は 61.9 $\mu$ M と算出され、200 $\mu$ M においては、細胞生存率は 0.9%であった。しかしながら、WST-8 を用いた細胞毒性試験の結果では 200 $\mu$ M において 50%を上回る細胞生存率であったため IC50 は算出されなかった (Fig. 12)。

高濃度範囲における 2 つの細胞毒性試験の結果の明確な不一致は、Mitochondrial reductase 活性を指標とした細胞毒性試験が luciferase 活性を指標とした細胞毒性試験と比較して、ARE の活性を luciferase の発現レベルで評価する皮膚感作性試験にも関わらず、Mitochondrial reductase の活性で細胞毒性を評価することから、細胞の遺伝子発現能力に影響を及ぼす細胞毒性を正しく反映しないことを示唆した。これと同様のことを Mertl *et al* (2019)も報告している。したがって、luciferase の発現を指標にした細胞毒性試験を採用することは、化学物質が細胞の転写活性に与える影響を正確に反映することが可能であると考えられた。

既存の KE-2 試験法 KeratinoSens<sup>TM</sup> や LuSens といった ARE-Nrf2 luciferase assay は、本試験で用いる用量を決定するために本試験とは別に予備試験として

WST-8 や MTT assay といった mitochondrial reductase 活性を指標とした細胞毒性試験を実施するが、これらの手法は実際の細胞の状態を反映していない。

近年、Mertl *et al.* (2019)は ARE-Nrf2 の活性を測定するレポーター遺伝子アッセイを NanoLuc で、細胞生存率を *Firefly luciferase* の活性で測定する Dual-Luciferase を用いた皮膚感作性試験法を用いて医療機器中の皮膚感作性物質のスクリーニングを報告している。

一方で、我々は *Firefly luciferase* 及び *Renilla luciferase* を用いた Dual-Luciferase を同じ目的で採用したが、更なる試みとして、ARE による転写活性を、*luciferase* を指標として測定した生細胞数で標準化して皮膚感作性を評価した。

*Renilla luciferase* の活性は、化学物質が細胞の転写活性に与える効果に影響されるため、被験物質が ARE-Nrf2 による転写活性に与える実際の影響を反映している。従って、我々は生細胞における ARE-Nrf2 の活性化による転写活性を正しく評価にするために、*Renilla luciferase* の活性を指標とした生細胞数で標準化する新たな評価パラメーターである nAA を考案し、導入した。

KeratinnoSens™ の施設間バリデーションで試験された 28 の物質を試験したところ、皮膚感作性陰性の物質の最大 nAA は 0.85-1.32 の範囲となり、皮膚感作性陽性の物質の最大 nAA は 1.76-26.42 となった (Table 20)。

さらに  $\alpha$ -Sens を用いた感作性判定のための最適なカットオフを決定するため



に LLNA 及びヒトのデータに対する一致率を算出した。結果として皮膚感作性陰性の物質の最大 nAA+2SD である 1.57 を上回る 1.6 を最適カットオフとして決定した。このカットオフを用いた時の LLNA 及びヒトのデータに対する一致率はそれぞれ 96.4 及び 100.0%となった (Table 21)。

$\alpha$ -Sens、KeratinoSens<sup>TM</sup> 及び LuSens の LLNA 及びヒトのデータに対する accuracy (%), sensitivity (%) 及び specificity (%) を Table 23 にまとめた。我々が新たに開発した手法は LLNA に対する accuracy (%), sensitivity (%) 及び specificity (%) はそれぞれ 96.4%、95.0% 及び 100% と算出され、ヒトのデータに対しては全て 100% となった。

本研究では、 $\alpha$ -Sens では nAA を用いることで KeratinoSens<sup>TM</sup> 及び LuSens で偽陰性となったを陽性と判定でき、LuSens で偽陽性となった Methyl salicylate を陰性と判定できた (Fig. 14a)。加えて、同じく Dual-Luciferase を用いた Mertl *et al.* (2019) の手法で偽陰性となった Methyl dibromoglutaronitril を陽性と判定できた (Fig. 14b)。 $\alpha$ -Sens における Methyl dibromoglutaronitril の陽性判定は、*Firefly luciferase* の Fold induction のみでも陽性と判定できたことから、レポーター遺伝子の構成もしくは宿主細胞によるものであると考えられた。

我々の結果は nAA を用いることで他の KE-2 試験法よりもより良い予測精度であることを示唆している。更に、既存の OECD TG に収載されている

KeratinoSens™ 及び LuSens と比較し、ARE による転写活性及び細胞毒性を同時に測定するため簡便かつ試験期間が短くなった。

Otake *et al* は、産業的によく使用されている Isocyanates を対象として、LLNA と動物を用いない皮膚感作性試験代替法の組合せ評価の結果の比較し、一部の物質で *in vitro* 試験である h-CLAT (OECD TG442E) (OECD, 2016) に関して偽陰性を示したことが組合せ評価において感作性強度が過小評価された要因であったと報告している。原因として Isocyanates の高い反応性を挙げ、無血清培地を用いて再評価したところ正しく陽性判定を得たことから、細胞と反応する以前に培地中の血清タンパク質と容易に反応したことが偽陰性の判定の一因となった可能性を指摘している (Otake *et al.*, 2018)。このことは、細胞を用いる KE-2 の試験法においても起こりうることが考えられる。既存の KE-2 試験法が血清含有の培地を用いるのに対し、我々の手法では血清を含まない Epi-Life 培地を用いているため、このような問題を防げることが期待できる。さらに細胞実験で汎用的に使用されるウシ血清を用いないことは動物愛護の点でも利点がある。

したがって、我々の開発した  $\alpha$ -Sens は簡便かつ予測精度の高い *in vitro* 皮膚感作性試験法であると考えられた。

## 終章 総括と結論

化学物質の皮膚感作性は、化粧品、医薬品原料及び農薬など、さまざまな化学物質の承認申請において評価が必要な健康有害性であり、化学物質の皮膚感作性の評価は公衆衛生及び労働衛生上非常に重要である。

近年、皮膚感作性を定量的に評価でき、動物愛護の面でも優れた **Local Lymph Node Assay (LLNA、OECD TG429)** が開発され、動物を用いる皮膚感作性試験においては第一選択となっており、世界的にも広く利用されている。さらに、動物愛護の観点から動物を用いない試験法の開発及び公定化が活発化しており、現段階では完全な移行は不可能なものの、近年の皮膚感作性試験を取り巻く環境は動物を用いない試験の利用へと移行する流れになっている。

化学物質のヒトへの有害性影響を軽減させるためには試験法の整備と並行してリスクコミュニケーションが必要である。そのためのツールとして、国際連合によって定められた **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)** があり、世界中で広く利用されている (UN、2019)。GHS では皮膚感作性については、皮膚感作性を有する情報のある物質に関しては区分 1 と分類され、その中でも強い感作性物質は区分 1A、その他の感作性物質は区分 1B と細区分される。この細区分に関しては **OECD TG406** 及び **OECD**

TG429 の試験結果を用いて分類可能で、現在 *in vitro* 試験法を含むその他の試験法に関しては区分 1 まで分類が可能である。細区分は消費者や労働者に強い感作性物質を警告できるため、より正確なリスクアセスメントを可能にし、ヒトの健康を守るためにも非常に有益な情報となる。

動物を用いた試験法では LLNA が主流となっているが、LLNA は放射性同位体 (RI) を用いるため、日本国内においては法令に従い専用の放射線施設ならびに国家資格である放射線取扱主任者の選任が必要となり、実施が困難であった。これを克服するため、これまでに我々は RI を用いない LLNA:BrdU-ELISA を開発 (Takeyoshi *et al.*, 2001)、テストガイドライン化し (OECD, 2018)、既に実用化されている。しかしながら、LLNA:BrdU-ELISA は GHS 細区分の基準が存在しないため、リスクコミュニケーションとして強い感作性物質を警告するためには、本法を用いた新たな基準を設定する必要があった (課題①)。

また、皮膚感作性の 1 つの表現系として光アレルギー性があり、化粧品や医薬品の有害性作用として重要である。評価方法としては従来モルモットを用いた試験法が一般的に用いられているが、これらの既存の光アレルギー性試験法は、惹起相の皮膚反応を評価するため、比較的多くの動物と長い実験期間を必要とし、動物愛護の面で問題を有していた。さらに、ICH ガイドライン S10 (2013) では、これらの既存の光アレルギー性試験法は、ヒトに対して予測可能性が未知

であり、経皮暴露される光アレルギー性物質を予測に用いることは推奨されないとされている。そのため、LLNA のような動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法の開発が必要である（課題②）。

ここまで、動物を用いる皮膚感作性試験の課題を挙げてきたが、動物を用いない皮膚感作性試験にも課題があった。これまでに開発され OECD TG 化されてきた代替法は OECD の皮膚感作性 AOP 中の KE-1、KE-2 及び KE-3 のいずれか 1 種をカバーした試験となっている。いずれの試験法も単独での試験法では測定精度上に問題があるため、異なる原理の代替法を組み合わせる評価する Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) が OECD でガイダンス化されつつある (OECD, 2019)。このうち、KE-2 を評価する試験法としては KeratinoSens<sup>TM</sup> 及び LuSens と呼ばれる手法が OECD TG442D (OECD, 2018) となっており、広く利用されている。しかしながら、これらの試験法は偽陰性及び偽陽性と判定される物質があり、測定精度上の問題を有する。さらに本試験で用いる用量を決定するために細胞毒性を評価するため別に予備試験を必要とし、本試験においてもケラチノサイトの活性化とは別に細胞毒性試験をする必要があり煩雑である。そこで、ヒトへの感作性リスク低減のためにより高精度かつ簡便な試験法の開発が必要となっている（課題③）。

以上のことから、本研究では、課題①に対しては我々が開発した LLNA :

BrdU-ELISA を用いた GHS 細区分の基準の設定と実用性の検証を行い、課題②に対しては皮膚感作性試験法として信頼性の高い LLNA を応用した高精度かつ簡便な新規光アレルギー性試験法の開発を行い、課題③に対してはケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時評価可能な簡便かつ予測精度の高い新規 *in vitro* 皮膚感作性試験法の開発を行い、皮膚感作性試験法の適用性を拡大することでこれらの課題の解決を試みた。

LLNA : BrdU-ELISA を用いた GHS 細区分の基準の設定と検証では、新たな GHS 細区分基準である EC1.6 値、6%を見出し、LLNA の GHS 分類結果との一致率は、区分 1A 及び区分 1B はそれぞれ 92.3%及び 84.2%と算出され、区分 1A に関しては唯一不一致であり、マウスの系統間によって結果が異なる 2-Mercaptbenzothiazole を除けば区分 1A の一致率は 100%となった。さらに汎用系統である CBA/J マウスを用いた LLNA : BrdU-ELISA から得られた EC1.6 を用いて検証した結果、LLNA との GHS 分類の一致率は GHS 区分 1A 及び GHS 区分 1B どちらも一致率は 100%となり、本研究で設定した LLNA:BrdU-ELISA の新たな GHS 細区分基準 (GHS 区分 1A:EC1.6 $\leq$ 6%、GHS 区分 1B:EC1.6 $>$ 6%) は、GHS 細区分に適用可能であると考えられた。

LLNA を応用した新規光アレルギー性試験法の開発では、UV 吸収の測定 (ステップ 1)、皮膚感作性及び光毒性の評価 (ステップ 2)、光アレルギー性評

価（ステップ3）の3ステップから構成される光安全性 LLNA を開発した。開発した試験法から得られた光アレルギー性の結果と既知の光アレルギー性の情報を比較したところ、全物質陽性/陰性の判定は一致した。さらに Doxycycline や Minocycline といった構造が類似しているものの光アレルギー性が異なる物質に関しても、正しく評価することができた。これらのことから、感作相で皮膚感作性を評価する LLNA を応用し、惹起が不要で動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法を開発できたと考えられた。

次に、我々はケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時に試験可能な新規 KE-2 試験法である  $\alpha$ -Sens を開発した。 $\alpha$ -Sens は新たな評価パラメーターである normalized ARE Activity (nAA) を用いることにより、ヒトのデータに対して、accuracy（正確度）、sensitivity（感度）及び specificity（特異度）はすべて 100%となり、既存の KE-2 試験法よりも高精度であった。さらにケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時に試験可能であるため、既存の KE-2 試験法で必要であった予備試験が不要であり、既存の KE-2 試験法よりも簡便であった。したがって、我々の開発した  $\alpha$ -Sens は高精度かつ簡便な試験法であると考えられた。

本研究成果により、LLNA:BrdU-ELISA を用いた最適な GHS 細区分の基準を提案することができ、実用の可能性を示すことができた。これにより放射線施

設を持たない試験機関においても LLNA を用いた GHS 細区分が可能となり、皮膚感作性の GHS 分類情報が増え、消費者ならびに労働者の健康保全への貢献が期待できる。

光アレルギー性においても、LLNA を応用することで、試験期間が短く、動物愛護にも優れ、かつ高精度な試験法を開発できた。これにより未だ不明なことが多くデータの少ない化学物質の光アレルギー性の情報の蓄積が可能となった。さらに LLNA の利点である EC3 のような光アレルギー性強度を定量的に評価できる指標を開発することで光アレルギー性のリスクアセスメントが期待できる。

また、動物を用いない皮膚感作性試験代替法として高精度かつ簡便な  $\alpha$ -Sens を開発し、動物を用いなくても高精度な皮膚感作性の評価が可能になった。さらに、他の代替法との組合わせた評価においても、 $\alpha$ -Sens を組み込むことでより高精度かつ簡便にできると考えられた。

以上のことから、本研究成果は、化学物質のヒトに対する有害性評価及びリスクコミュニケーションの発展と、化学物質によるヒトへの有害影響の低減に貢献できるものと期待される。



## 研究発表実績

### 研究論文

1. **Maeda Y**, Hirosaki H, Yakata N, Takeyoshi M. 2016. Comparison of outcomes obtained in murine local lymph node assays using CBA/J or CBA/Ca mice. *J Appl Toxicol.* 36, 1011-1014.
2. **Maeda Y**, Hirosaki H, Yamanaka H, Takeyoshi M. 2018. New approach to predict photoallergic potentials of chemicals based on murine local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 38, 1316-1322.
3. **Maeda Y**, Takeyoshi M. 2019. Proposal of GHS sub-categorization criteria for LLNA: BrdU-ELISA (OECD TG442B). *Regul Toxicol Pharmacol.* 107.
4. Kobayashi T, **Maeda Y**, Kondo H, Takeyoshi M. 2020. Applicability of the proposed GHS sub-categorization criterion for LLNA: BrdU-ELISA (OECD TG442B) to the CBA/J strain mouse. *J Appl Toxicol.* impress.
5. **Maeda Y**, Takeyoshi M, Chuma T, Iwata H. 2020.  $\alpha$ -Sens: the improved ARE-Nrf2-based sensitization screening assay using normalized transcriptional activity. *Toxicology.* 439.

## 学会発表

1. 前田 洋祐、広崎 春佳、屋形 直明、小林 俊夫、樽木 正範、武吉 正博. 2012. CBA/J あるいは CBA/Ca マウスを用い OECD TG429 に準拠した LLNA 試験並びに CBA/J マウスを用い TG442B に準拠した LLNA 試験の定量的比較. 日本動物実験代替法学会第 25 回大会.
2. 前田 洋祐、広崎 春佳、屋形 直明、武吉 正博. 2015. Murine local lymph node assay (LLNA) を応用した新規光アレルギー性試験法の開発. 第 42 回日本毒性学会学術年会.
3. 前田 洋祐、広崎 春佳、山中 秀徳、中井 誠、武吉 正博、岩田 祐之. 2017. Nrf2-keap1-ARE 経路を応用した一過性発現系による *in vitro* 皮膚感作性試験代替法の開発. 日本動物実験代替法学会第 30 回大会.
4. 近藤 悠、前田 洋祐、小林 俊夫、武吉 正博. 2018. LLNA:BrdU-ELISA (OECD TG442B) を用いた GHS 細区分のための判定基準の提案. 日本動物実験代替法学会第 31 回大会.
5. 前田 洋祐、武吉 正博、中馬 猛久、岩田 祐之. 2019. Dual luciferase を用いた ARE-Nrf2 based skin sensitization screening assay の改良. 日本動物実験代替法学会第 32 回大会.

## 要約

化学物質の皮膚感作性の評価は公衆衛生及び労働衛生上非常に重要である。

近年、化学物質の皮膚感作性評価にはモルモットもしくはマウスを用いた試験法が用いられてきたが、動物愛護の観点から近年の皮膚感作性試験を取り巻く環境は動物を用いない試験法へ移行する流れになっている。

化学物質のヒトへの有害性影響の軽減のためには、試験法の整備と並行してリスクコミュニケーションが必要である。そのためのツールとして、**Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)** があり、広く利用されている。GHS では皮膚感作性を有する情報のある物質に関しては区分 1 と分類され、その中でも強い感作性物質は区分 1A、その他の感作性物質は区分 1B と細区分される。細区分は強い感作性物質を警告できるため、より正確なリスクアセスメントを可能にし、ヒトの健康を守るためにも非常に有益な情報となる。

動物を用いた試験法では **Local Lymph Node Assay (LLNA)** が主流となっているが、LLNA は放射性同位体 (RI) を用いるため、日本国内では実施が困難であった。これまでに我々は RI を用いない **LLNA:BrdU-ELISA** を開発、テストガイドライン化し、実用化している。しかしながら、本法は **GHS 細区分の基準**

が存在しないため、強い感作性物質を警告するためには、本法を用いた新たな基準を設定する必要があった（課題①）。

また、皮膚感作性の 1 つの表現系である光アレルギー性は、化学物質の有害性作用として重要である。既存の光アレルギー性試験法は、惹起相の皮膚反応を評価するため、比較的多くの動物と長い実験期間を必要とし、動物愛護の面で問題を有していた。さらに、ICH ガイドライン S10 では、既存の光アレルギー性試験法は、ヒトに対して予測可能性が未知であり、推奨されないとしている。そのため、動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法の開発が必要である（課題②）。

一方、動物を用いない皮膚感作性試験にも課題があった。これまでに開発され OECD TG 化されてきた代替法のうち、ケラチノサイトの活性化を評価する試験法として KeratinoSens™ 及び LuSens が OECD TG442D となっている。しかしながら、これらの試験法は偽陰性及び偽陽性と判定される物質があり、測定精度上の問題を有する。さらに本試験で用いる用量を決定するためにあらかじめ細胞毒性を評価する必要があり、煩雑である。そこで、ヒトへの感作性リスク低減のために高精度かつ簡便な試験法の開発が必要となっている（課題③）。

以上のことから、本研究では、課題①から課題③に対して、LLNA : BrdU-

ELISA を用いた GHS 細区分の基準の設定及び実用性の検証、LLNA を応用した高精度かつ簡便な新規光アレルギー性試験法の開発及びケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時評価可能な高精度かつ簡便な新規 *in vitro* 皮膚感作性試験法の開発を行い、これらの課題の解決を試みた。

まず課題①に対して、新たな GHS 細区分基準 EC1.6 値、6%を見出し、LLNA の GHS 分類結果との一致率は、区分 1A 及び区分 1B はそれぞれ 92.3%及び 84.2%と算出された。さらに、汎用系統である CBA/J マウスを用いて得られた EC1.6 を用いて検証した結果、LLNA との GHS 分類の一致率は全て 100%となり、本法の新たな GHS 細区分基準は、GHS 細区分に適用でき、実用可能性があることが示された。

次に、課題②に対して LLNA を応用し、光安全性 LLNA を開発した。開発した試験法から得られた結果と既知の光アレルギー性情報は全物質一致した。さらに構造が類似しているものの光アレルギー性が異なる物質に関しても、正しく評価することができた。これらのことから、LLNA を応用し、動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法を開発できたと考えられた。

最後に、課題③に対してケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時に試験可能な新規 *in vitro* 試験法である  $\alpha$ -Sens を開発した。本法から得られた結果はヒトの感作性情報に対して全て一致し、既存の試験法よりも高精度であった。さ

らに細胞毒性を同時に試験可能であるため、予備試験が不要であり、簡便であった。したがって、 $\alpha$ -Sens は高精度かつ簡便な試験法であると考えられた。

以上のことから、本研究成果は先に挙げた 3 つの課題の解決に貢献でき、化学物質のヒトに対する有害性評価及びリスクコミュニケーションの発展と、化学物質によるヒトへの有害影響の低減に貢献できるものと期待される。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始温かいご指導・ご教示いただいた山口大学 教授  
岩田 祐之 先生ならびに一般財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価  
技術研究所 武吉 正博 副所長に心より謝意を示します。また、絶えず有意  
義なご指導・ご助言をいただいた鹿児島大学 教授 中馬 猛久 先生に深謝  
いたします。本研究の遂行に関し、多大なるご理解とご協力をいただいた、一  
般財団法人 化学物質評価研究機構 細川 幹夫 名誉理事長、今田中 伸哉  
理事長、同安全性評価技術研究所 窪田 清宏 所長をはじめ、ご理解・ご協  
力頂いた安全性評価技術研究所職員各位に感謝の意を表します。

最後に、温かく見守ってくれた妻と大きな活力を与えてくれた愛娘に深く感  
謝いたします。

## 参考文献

- Anzai T., Ullmann L.G., Hayashi D., Satoh T., Kumazawa T., Sato K. 2010. Effect of strain Differences and Vehicles on Results of Local Lymph Node Assay. *Exp Anim.* 59:245-249.
- Buehler E.V. 1965. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch Dermatol.* 91:171-175.
- Basketter D.A., Scholes E.W. 1992. Comparison of the local lymph node assay with the Guinea-Pig Maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food Chem Toxicol.* 30: 65-69.
- Basketter D.A., Selbie E. A., Scholes E.W., Lees D., Kimber I., Botham P.A. 1993. Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximization, Buehler and local lymph node assays. *Food Chem Toxicol.* 31, 63-67.
- Basketter D.A., Gerberick G.F., Kimber I., Loveless S.E. 1996. The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem Toxicol.* 34: 985-997.
- Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. 1999. A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local



- lymph node assay dose responses. *J Appl Toxicol.* 19, 261-266.
- Basketter D.A., Blaikie L., Dearman R.J., Kimber I., Ryan C.A., Gerberick G.F., Harvey P., Evans P., White I.R., Rycroft R.J. 2000. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis.* 42:344-348.
- Bonamonte D., Foti C., Lionetti N., Rigano L., Angelini G. 2010. Photoallergic contact dermatitis to 8-methoxypsoralen in *Ficus carica*. *Contact Dermatitis.* 62, 343-348.
- Cardoso J.C., Canelas M.M., Goncalo M. F. 2009. Photopatch testing with an extended series of photoallergens: a 5-year study. *Contact Dermatitis.* 60, 325-329.
- Cooper, J.A., Saracci, R., Cole, P. 1979. Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br J Cancer.* 39, 87.
- DB-ALM (INVITTOX). 2013. Protocol 155. <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/search/155>. (accessed on 30 July 2019).
- European Union (EU). 2013. Ban on Animal Testing. [https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/animal-testing\\_en](https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/animal-testing_en). (accessed on 27 August 2019).
- Fukuyama, T., Tajima, Y., Ueda, H., Hayashi, K., Kosaka, T. 2011. Prior exposure to

- immunosuppressive organophosphorus or organochlorine compounds aggravates the TH1-and TH2-type allergy caused by topical sensitization to 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride. *J Immunotoxicol.* 8, 170-182.
- Gao L., Hu Y., Ni C., Xu Y., Ma L., Yan S., Dou X. 2014. Retrospective study of photopatch testing in a Chinese population during a 7-year period. *Dermatitis.* 25, 1:22-26.
- Gerberick G.F., Ryan C.A. 1990a. A predictive mouse ear-swelling model for investigating topical photoallergy. *Food Chem Toxicol.* 28, 5:361-368.
- Gerberick G.F., Ryan C.A. 1990b. Use of UVB and UVA to induce and elicit contact photoallergy in the mouse. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 7, 13-19.
- Green M.C., Kaufer K.A. 1965. A test for histocompatibility between sublines of the CBA strain of mice. *Transplantation* 3, 767-768.
- Ha S., Ahn I.Y., Kim D., Lee J.K., Sohn S., Jung M.S., Heo Y., Omori T., Bae S., Lim K.M. 2017. Evaluation of radioisotopic and non-radioisotopic versions of local lymph node assays for subcategorization of skin sensitizers compliant to UN GHS rev 4. *Regul Toxicol Pharmacol.* 85, 124-131.
- Herber L.C. 1969. Use of guinea-pigs in photobiologic studies. In *The Biologic Effects of Ultraviolet Radiation*. In: Urbach F (ed) Pergamon Press, New York, pp 291-295.

ICH S10 Guideline. 2013. Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals.

Kimber I., Hilton J., Weisenberger C. 1989. The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation. *Contact dermatitis*. 21: 215-220.

Kimber I., Basketter D.A., Gerberick G.F., Dearman R.J., 2002. Allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.* 2, 201– 211.

Kimber I., Basketter D.A., Butler M., Gamer A., Garrigue J.L., Gerberick G.F., Newsome C., Steiling W., Vohr H.W., 2003. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol.* 41, 1799-1809.

Kimber I., Basketter D.A., Gerberick G.F., Ryan C.A., Dearman R.J. 2011. Chemical allergy: Translating biology into hazard characterization. *Toxicol Sci.* 120, 238-268.

厚生労働省. 2018. 医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンス. 薬生薬審発 0111 第 1 号.

Kojima H., Takeyoshi M., Sozu T., Awogi, T., Arima K., Idehara K., Ikarashi Y., Kanazawa Y., Maki E., Omori T., Yuasa A., Yoshimura I., 2011. Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J Appl Toxicol* 31, 63-74.

- Magnusson B., Kligman A.M. 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol* 52, 268-276.
- Matsuo I. 2002. Photocontact dermatitis. In: Photosensitive dermatoses, 3rd edn. Sato Y., Ichibashi M., Horio T. (ed) KANEHARA & Co., LTD, Tokyo, pp 124-131.
- Mertl E., Riegel E., Glück N., Ettenberger-Bornberg G., Lin G., Auer S., Haller M., Wlodarczyk A., Steurer C., Kirchnawy C., Czerny T. 2019. A dual luciferase assay for evaluation of skin sensitizing potential of medical devices. *Mol Biol Rep.* 46, 5089–5102.
- Och, F.M.M.V., Slob, W., Jong, W.H.D., Vandebriel, R.J., Loveren, H.V. 2000. A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins. *Toxicology.* 146, 49-59.
- Ohtake T., Maeda Y., Hayashi T., Yamanaka H., Nakai M., Takeyoshi M. 2018. Applicability of an Integrated Testing Strategy consisting of in silico, in chemico and in vitro assays for evaluating the skin sensitization potencies of isocyanates. *Toxicology.* 393, 9-14.
- Onoue S., Seto Y., Sato H., Nishida H., Hirota M., Ashikaga T., Api A.M., Basketter D.A., Tokura Y. 2017. Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms,

classification, and risk assessments. *J Dermatol Sci.* 85, 4-11.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 1992. OECD

GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS No.406, Skin Sensitization.

OECD, Paris.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2004. OECD

GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS No.432, *In Vitro* 3T3 NRU

phototoxicity test. OECD, Paris.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2010. OECD

GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS No.429, Skin Sensitization:

Local Lymph Node Assay. OECD, Paris.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2012. The adverse

outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins

Part 1: scientific evidence. Series on Testing and Assessment No.168. OECD,

Paris.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018a. OECD

GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS No.442B, Local Lymph Node

Assay: BrdU-ELISA or -FCM. OECD, Paris.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018b. Key event

based test guideline 442D. In vitro skin sensitisation assays addressing the AOP key event on keratinocyte activation OECD guidelines for the testing of chemicals. OECD, Paris.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018c. Key event based test guideline 442E. In vitro skin sensitization assays addressing the keyevent on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation. OECD, Paris.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2019. Draft OECD Guideline Defined Approaches for Skin Sensitisation. OECD, Paris.

Ryan C.A., Chaney J.G., Gerberick G.F., Kern P.S., Dearman R.J., Kimber I., Basketter D.A. 2007. Extrapolating local lymph node assay EC3 values to estimate relative sensitizing potency. *Cutan Ocul Toxicol.* 26, 135-145.

Salvador J.M.O., Martínez A.E., Ferrer D.S., Martínez A.M.V., Oyanguren J.C.V., Ninet Z. 2017. Pediatric Allergic Contact Dermatitis: Clinical and Epidemiological Study in a Tertiary Hospital. *Actas Dermo-Sifiliográficas.*108, 571-578.

Sato Y., Katsumura Y., Ichikawa H., Kobayashi T., Nakajima K. 1980. Development of Contact Photosensitization Test in Guinea Pigs (Adjuvant-Strip Method). *Nishinohon*

*J Dermatol.* 42, 831-837.

Scalf A.L., Davis D.P.M., Rohlinger A.L., Cannolly S.M. 2009. Photopatch testing of 182 patients: A 6-year experience at the Mayo Clinic. *Dermatitis.* 20, 1:44-52.

Takeyoshi M., Yamasaki K., Yakabe Y., Takatsuki M., Kimber I. 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 119, 203-208.

Takeyoshi M., Sawaki M., Yamasaki K., Kimber I. 2003. Assessment of statistics analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with  $\alpha$ -hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology.* 191, 259-263.

Takeyoshi M., Kuga N., Yamasaki K. 2003. Development of a high-performance reporter plasmid for detection of chemicals with androgenic activity. *Arch Toxicol.* 77, 274-9.

Takeyoshi M., Noda S., Yamasaki K. 2004. Differences in responsiveness of mouse strain against *p*-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 53, 171-173.

Takeyoshi M., Iida K., Shiraishi K., Hoshuyama S., 2005. Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 25, 129-134.

武吉 正博. 2005. 化学物質のアレルギー性検査の現状と新しい試験法. 機能材料. 25, 9. 55-64.

Takeyoshi M., Noda S., Yamasaki K. 2006. Advantage of using CBA/N strain mice in a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 26, 5-9.

The european multicentre photopatch test study taskforce. 2012. A European multicenter photopatch test study. *Br J Dermatol.* 166, 1002-1009.

The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). 2009. Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. [http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox\\_docs/llna-ips/llnaperfstds.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna-ips/llnaperfstds.pdf) (accessed on March 16, 2020).

The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). 2010a. ICCVAM Test Method Evaluation Report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. A Nonradioactive Alternative Test Method to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox\\_docs/llna-elisa/tmer.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna-elisa/tmer.pdf) (accessed on 2 July 2018).

The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods



(ICCVAM), 2010b. ICCVAM test method evaluation report on the murine local lymph node assay: DA, a nonradioactive alternative test method to assess the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products.

[https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox\\_docs/llna-da/tmer.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna-da/tmer.pdf) (accessed on 24 March 2019).

The Jackson Laboratory. 2002. Genetic Background Effects: Can Your Mice See? JAX® NOTES. 458:2-3. <http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/485.pdf/> (accessed on 13 July 2015).

Tokura Y. 2001. Photoallergy : From Basic Research to Clinical correlates. *Jpn J Dermatol.* 111, 1-12.

Tokura Y. 2009. Photoallergy. *Expert Rev Dermatol.* 4, 263-270.

Tzutzuy R., Annette M., Susanne N. K., Christoph J. W., Wera T., Tobias E., Alexandra A., Daniel U., Ben V. R., Robert L. 2014. LuSens: A keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro.* 28, 1482-1497.

United Nations. 2019. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) 8th revised edition. CHAPTER 3.4 RESPIRATORY OR SKIN SENSITIZATION. United Nations Publications. New York. 153-161.

Ulrich P., Homey B., Vohr H.W. 1998. A modified murine local lymph node assay for the differentiation of contact photoallergy from phototoxicity by analysis of cytokine expression in skin-draining lymph node cells. *Toxicology*. 125, 149-168.

Woolhiser M.R., Munson A.E., Meade B.J. 2000. Comparison of mouse strains using the local lymph node assay. *Toxicology*. 146: 221–227.